Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr.D. H e n s c h l e r

KINETIK DER BILDUNG UND RÜCKBILDUNG VON METHÄMOGLOBIN BEI EINATMUNG VON STICKSTOFFMONOXYD AN KANINCHEN UND RATTE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Gunther Kraft
aus
Berlin

Würzburg 1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544724_0034

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr.D. Henschler

KINETIK DER BILDUNG UND RÜCKBILDUNG VON METHÄMOGLOBIN BEI EINATMUNG VON STICKSTOFFMONOXYD AN KANINCHEN UND RATTE

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Günther Kraft
aus
Berlin

Würzburg 1967

Referent: Professor Dr. D. Henschler

Tag der Promotion: 15. 6. 67

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

MEINEN LIEBEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 1

I. Chemie der nitrosen Gase und ihre Wirkung auf den Organismus 2

II. Die Entstehungsmöglichkeiten von Stickoxyden 4

III. Vergiftungsmöglichkeiten und Klinik der Vergiftung 5

B. PROBLEMSTELLUNG 10

C. BLUTFARBSTOFFÄNDERUNG UNTER STICKSTOFF-MONOXYDINHALATION 12

I. Methodik 12

1. Herstellung von Stickstoffmonoxyd 12

2. Versuchsanlage 12

3. Bestimmung von Stickstoffmonoxyd 15

4. Versuchstiere 16

a. Kaninchen 17

b. Ratten 17

5. Exposition der Versuchstiere 18

a. Kaninchen 18

b. Ratten 18

6. Herstellung einer Erythrocytenaufschwemmung mit vollständig zu Methämoglobin umgewandeltem Hämoglobin 19

7. Methämoglobinbestimmung 19

8. Spektrale Untersuchung von Bluthämolysaten 21

a. Versuche in vivo 21

b. Versuche in vitro 22

9. Differenzierung der Absorptionsspektren 23

Seite

II. Ergebnisse 26

1. Kaninchen 26

a. Die Methämoglobinbildung während der Einatmung verschiedener Konzentrationen von Stickstoffmonoxyd 26

b. Die Rückbildung von Methämoglobin 28

aa. Nach Stickstoffmonoxydinhalation 28

bb. Nach Natriumnitrit intravenös 28

cc. Nach Reinfusion von Erythrocyten mit annähernd 100% Methämoglobin, erzeugt durch Natriumnitrit in vitro 29

2. Ratte 29

a. Die Methämoglobinbildung während der Inhalation verschiedener Konzentrationen von Stickstoffmonoxyd 29

b. Die Rückbildung von Methämoglobin 31

aa. Nach Stickstoffmonoxydinhalation 31

bb. Nach Natriumnitrit intravenös 32

cc. Nach Reinfusion von Erythrocyten mit annähernd 100% Methämoglobin, erzeugt durch Natriumnitrit in vitro 32

3. Spektrale Untersuchungen von Blutfarbstoffderivaten der Ratte nach Stickstoffmonoxydeinwirkung in vivo und in vitro 33

D. DISKUSSION 38

E. ZUSAMMENFASSUNG 41

F. LITERATUR I - IV

A. EINLEITUNG

Die vornehmste Aufgabe des Hämoglobins ist die Bindung des Sauerstoffs zum Transport von der Lunge ins Gewebe.

Es handelt sich beim Hämoglobinmolekül um ein Protein vom Molekulargewicht 67 000. Das Molekül besteht aus vier Peptidketten, von denen je zwei identisch sind. Jede dieser Ketten trägt ein Häm. Die Peptidketten sind so angeordnet, daß die vier Hämanteile auf der Außenseite einer räumlichen Struktur zu liegen kommen (PERUTZ 1962). Jede Hämgruppe kann ein Sauerstoffmolekül aufnehmen. Das Hämoglobin geht dadurch in Oxyhämoglobin über. Innerhalb des Moleküls nimmt das Eisen eine zentrale Stellung ein. Es hat eine stabile Bindung zum Porphyrin, eine labile zum Globin. In dieser Situation ist das Eisen 2-wertig. Wird seine Wertigkeit erhöht, so geht das Hämoglobin ins Methämoglobin über. Die neuentstandene Verbindung kann keinen Sauerstoff mehr aufnehmen und somit nicht mehr die eigentliche Aufgabe des Hämoglobins erfüllen.

Der Sauerstoff hat jedoch nach KIESE (1946) nicht nur die Fähigkeit, sich an das Hämoglobin anzulagern und es damit in Oxyhämoglobin zu überführen, sondern er reagiert in einer zweiten Reaktion, ebenfalls einer Oxydation, mit dem Hämoglobin, wobei Methämoglobin entsteht. KIESE errechnete, daß innerhalb einiger Stunden das Hämoglobin zum größten Teil in Methämoglobin umgewandelt wäre, würde nicht ein Fermentsystem für ständige Rückbildung sorgen. Diese ständige Reduktion läuft über NAD (Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid) und NADP (Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat) und steht mit dem Glucoseabbau eng in Verbindung. Dadurch wird der Methämoglobinspiegel normalerweise immer unter 1,0% gehalten (RAPOPORT 1964).

Sämtliche Stoffe, die das 2-wertige Eisen im Hämoglobin oxydieren können, haben wie der Sauerstoff die Fähigkeit, Methämoglobin zu bilden. Von besonderer Bedeutung sind in dieser Hinsicht die aromatischen Amine und die Nitroverbindungen. Unter den Nitroverbindungen sind es insbesondere die nitrosen Gase, deren Toxikologie von jeher einen breiten Raum in unserem Interesse einnimmt.

I. CHEMIE DER NITROSEN GASE UND IHRE WIRKUNG AUF DEN ORGANISMUS

Alle gasförmigen Oxyde des Stickstoffs werden zur Gruppe der "nitrosen Gase" zusammengefaßt. Nach der allgemeinen Summenformel

$$N_2O_n \ (n = 1\text{-}6)$$

ergeben sich danach:

N_2O	Distickstoffmonoxyd
$(N_2O_2) \rightleftharpoons 2\ NO$	Stickstoffmonoxyd
N_2O_3	Distickstofftrioxyd
$NO_2 \rightleftharpoons N_2O_4$	Stickstoffdioxyd $\rightleftharpoons$ Distickstofftetroxyd
N_2O_5	Distickstoffpentoxyd
N_2O_6	Distickstoffhexoxyd.

D i s t i c k s t o f f m o n o x y d (Stickoxydul, Lachgas) gehört nicht zu den Reizgasen und ist aufgrund seiner narkotischen Wirkungen für unsere Betrachtungen weniger von Interesse.

S t i c k s t o f f m o n o x y d ist ein farbloses Gas, das in Wasser wenig löslich ist. Der Siedepunkt liegt bei -152°C. Unter geeigneten Bedingungen wird NO leicht vom Sauerstoff zu NO_2 oxydiert. Bei Temperaturen bis um +650°C ist es stabil.

D i s t i c k s t o f f t r i o x y d hat lediglich theoretische Bedeutung, da es erst unter -10°C stabil ist. Bei +25°C ist es bereits zu 90% in NO und NO_2 dissoziiert.

D i s t i c k s t o f f t e t r o x y d ist das dimere Stickstoffdioxyd. Es besteht ein temperaturabhängiges Gleichgewicht in dem praktisch wichtigen Bereich zwischen -9°C und +135°C nach der Reaktionsgleichung $N_2O_4 \rightleftharpoons 2\ NO_2$. Bei -9°C liegt das Oxyd kristallin zugunsten der linken, bei +135°C gasförmig zugunsten der rechten Seite der Gleichung vor.

BODENSTEIN (1922) hat die Temperaturabhängigkeit des Gleichgewichtes in diesem unverdünnten Gemisch zuerst quantitativ erfaßt. Danach beträgt beispielsweise der Anteil des monomeren NO_2 bei 27°C 20, bei 50°C bereits 40 v.H.

D i s t i c k s t o f f p e n t o x y d, das Anhydrid der Salpetersäure, ist an der Luft sehr unbeständig und zerfällt rasch zu $N_2O_3 + O_2$.

D i s t i c k s t o f f h e x o x y d ist nur unter extremen Bedingungen existent und daher nur von theoretischem Interesse.

Die toxikologisch bedeutendsten Stickoxyde sind Stickstoffmonoxyd und Stickstoffdioxyd bzw. sein dimeres Stickstofftetroxyd. Die beiden Gase bilden auch quantitativ den Hauptanteil in dieser Gruppe. So nahe sie chemisch verwandt sind, so verschieden ist ihre Wirkungsweise im menschlichen und tierischen Organismus. NO_2 entfaltet seine Hauptwirkung in der Lunge und führt hier nach entsprechenden Dosen zum Lungenödem. NO wirkt dagegen hauptsächlich als Methämoglobinbildner im Blut. Während NO_2 eine schädigende Noxe setzt, die auch nach dem Ende des Einwirkens ihren Fortgang nimmt, bildet sich am Ende der NO-Wirkung der pathologisch veränderte Blutfarbstoff rasch zurück. FLURY (1930) hat diese Unterschiede schon früh erkannt und teilt daher die Vergiftungen durch nitrose Gase nach deren Reaktionsmerkmalen im Organismus ein:

1. Reizgastypus. Im Anschluß an die Gasinhalation werden mehr oder weniger starke Reizerscheinungen verspürt, die nach Wegfall der Noxe abklingen. Ist eine Latenzzeit von mehreren Stunden verstrichen, beginnt zunehmende Atemnot mit Cyanose. Der Tod tritt meistens nach 1-2 Tagen durch Lungenödem ein.

2. Reversibler Typus. Unmittelbar oder wenige Minuten nach Einatmen der nitrosen Gase treten Atemnot, Cyanose, Erbrechen, Schwindel oder sogar Bewußtlosigkeit ein. Im Blut ist stets eine starke Methämoglobinbildung zu finden. Beim Verbleib in der giftigen Atmosphäre kommt es zum Exitus, beim rechtzeitigen Verlassen erfolgt schnelle und vollkommene Erholung.

3. Schocktypus. Er tritt nur bei höchsten Gaskonzentrationen auf. Schwere Erstickungssymptome, Krämpfe, Atemstillstand.

4. Kombinierter Typus. Es setzen sofort cerebrale Erscheinungen, Schwindel, Benommenheit, Cyanose ein. Wird die giftige Atmosphäre verlassen, erfolgt scheinbare Erholung, nach einer Latenzzeit von mehreren Stunden jedoch wie beim Reizgastypus Atemnot, erneute Cyanose und meist Tod durch Lungenödem. Nach weiteren Untersuchungen ergab sich, daß Stickstoffdioxyd zum Reizgastypus gehört, während Stickstoffmonoxyd den Hauptanteil des reversiblen Typus ausmacht. Anders formuliert: Stickstoffdioxyd führt zu einer äußeren, Stickstoffmonoxyd zu einer inneren Erstickung.

II. DIE ENTSTEHUNGSMÖGLICHKEITEN VON STICKOXYDEN

Die Stickoxyde entstehen erstens durch Oxydation des Stickstoffs, zweitens durch Reduktion anorganischer Verbindungen und drittens aus organischen Verbindungen durch Fäulnis- und Zersetzungsprozesse. Als Folge der weiten Verbreitung des Stickstoffs in der Luft, im Tier- und Pflanzenreich und in der Erdrinde sind die Entstehungsmöglichkeiten seiner Oxyde nicht unerheblich.

Der molekulare Stickstoff jedoch ist äußerst reaktionsträge. Um ihn in die atomare Form umzuwandeln, werden stets große Mengen an Energie benötigt. Als Energiequellen kommen hier in erster Linie Druck und Temperatur sowie Strahlung in Betracht. Der atomare Stickstoff verbindet sich dann "in statu nascendi" außerordentlich rasch mit Sauerstoff und geht mit diesem mehr oder weniger stabile Verbindungen ein. Bei einer Temperatur von ca. 1400°C reagieren der Luftstickstoff und der Sauerstoff miteinander nach der Gleichung $N_2 + O_2 \rightarrow 2\ NO$; es ist also bei allen Vorgängen, die mit großer Wärmebildung einhergehen, mit erheblichen Mengen an Stickoxyden zu rechnen. So berichten AHLBERG und DAHLBERG (1942), daß sich beim Einschlagen eines Blitzes in einen Transformator große Mengen eines rotgelben, stechenden und hustenreizenden Gases entwickelten.

Als Beispiel für die Entstehung von NO aus seinen Elementen durch Strahlung mag die Untersuchung von DRELL und RUDERMAN (1962) gelten, die nach einer Atombombenexplosion Stickoxyde in 80-90 km Höhe fanden. Eine neuere Arbeit von NICOLET (1965) bestätigt, daß durch kosmische Strahlung in der niederen D-Region der Ionosphäre NO aus molekularem Stickstoff und Sauerstoff gebildet wird.

Eine weitaus größere Bedeutung für die Praxis besitzt die Entstehung durch Freiwerden von Stickoxyden aus anorganischen und organischen Verbindungen. Wird etwa aus der Salpetersäure durch ein geeignetes Reduktionsmittel, z.B. ein Metall, NO verdrängt ($3\ Cu + 8\ HNO_3 \rightarrow 3\ Cu(NO_3)_2 + 4\ H_2O + 2\ NO$), so kann das freiwerdende Stickoxyd Anlaß einer Vergiftung werden. Bei der verbreiteten Reinigungsart von Kupfer durch Eintauchen in Mischungen von Schwefelsäure, Salpetersäure, Kochsalz und Ruß, beim sog. Gelbbrennen, ist es daher schon oft zu schweren Intoxikationen gekommen.

Stärkste Bildung von nitrosen Gasen erfolgt, wenn Salpetersäure auf organische Stoffe trifft. Dies ist z.B. gegeben, wenn durch Bruch von Vorrats- und Transportgefäßen die Säure mit Papier, Holz oder Sägespänen in Berührung kommt (SCHULTZ-BRAUNS 1930). Endlich können nitrose Gase auch auf organischem Weg entstehen. Bei Fäulnis- und Zersetzungsvorgängen, wie sie des öfteren in Getreidesilos beobachtet wurden, entwickelten sich beachtliche Mengen von hochtoxischen Stickoxyden (GRAYSON, 1956; LOWRY und SCHUMAN, 1956).

III. VERGIFTUNGSMÖGLICHKEITEN UND KLINIK DER VERGIFTUNG

Die Gefährlichkeit der nitrosen Gase, die in starker Konzentration als "braune Dämpfe" auftreten können, wurde schon frühzeitig erkannt. So beschreibt DESGRANGES (1804) einen Fall, bei dem ein Arbeiter, der die Dämpfe nach dem Bruch einiger HNO_3-Flaschen kurz eingeatmet hatte, 15 Std danach ad exitum gekommen war. Einen ganz ähnlichen Fall berichtet CHARIER (1823). HUSEMANN und HUSEMANN (1862) schreiben in ihrem Handbuch der Toxikologie von mindestens 12 letal verlaufenen Fällen,

hervorgerufen durch Einatmen von Dämpfen rauchender Salpetersäure. Diese Unglücksfälle ereigneten sich nach ihrer Beschreibung teils bei chemischen Experimenten, teils auch in Salpeter- und Schwefelsäurefabriken nach dem Zerspringen von Flaschen, die rauchende Salpetersäure enthielten.

Obwohl also die Schädlichkeit dieser "braunen Gase" schon lange bekannt war, erließen die Berufsgenossenschaften erst "Verhaltungs- und Verhütungsvorschriften", nachdem DUISBERG (1897) zwei Fälle von Massenvergiftungen mit 30 bzw. 60 Erkrankungen beschrieben hatte und die Industrie auf die außerordentliche Vergiftungsgefahr beim Einatmen dieser Dämpfe hingewiesen worden war. SCHULTZ-BRAUNS hatte bis 1930 150 Fälle mit tödlichem Ausgang gesammelt. Ein Bericht von WADE, ELKINS und RUOTOLO (1950) zeigt, daß sich in der Zeit von 1930 bis 1949 wiederum 47 tödliche Vergiftungen mit nitrosen Gasen ereigneten. Weitere insgesamt 23 Vergiftungsfälle aus Frankreich, von ROCHE, MARIN und NICOLAS (1957) sowie von ROCHE, TOLOT, TOURAINE und NICOLAS (1957) mitgeteilt, zeigen, daß die Vergiftungen mit gasförmigen Stickoxyden nach wie vor erhebliches praktisches Interesse besitzen. Die größte Gefahr besteht naturgemäß für Betriebe, die Salpetersäure herstellen oder mit Salpetersäure arbeiten, da bei Berührung der Säure mit Metallen oder organischen Verbindungen NO freigesetzt wird.

Wie bereits erwähnt, ist bei hohen Temperaturen die Möglichkeit der direkten Vereinigung von Stickstoff und Sauerstoff gegeben. Es kommt daher bei der Metallbearbeitung mit Schweißgeräten wiederholt zu Vergiftungen besonders dann, wenn in engen Räumen gearbeitet wird. So berichten u.a. AHLBERG und DAHLBERG (1942) von einem Arbeiter, der im Wassertank von 15-20 m^3 Inhalt mit Acetylenschweißen beschäftigt war. Im Laufe seiner Arbeit stellten sich Atembeschwerden und Hustenreiz ein, die auch nach Verlassen des Tanks anhielten. Die Gesichtsfarbe war dunkelrot mit cyanotischem Einschlag. Die Krankheitssymptome dauerten bis zum Abend an, dann trat allmähliche Besserung bis zur Beschwerdefreiheit am dritten Tag ein. 1944 veröffentlicht LINDQVIST 16 Vergiftungsfälle bei Schweißern, von denen 4 tödlich verliefen. Alle Betroffenen hatten in engen Räumen gearbeitet. Von NEUMANN und BEYER wird 1949 nachdrücklich darauf hingewiesen, daß beim Autogenschweißen und -schneiden wie auch beim Elektroschweißen und in Bogenlampen aus Luftstickstoff und Sauerstoff

Stickstoffmonoxyd entsteht, das dann weiter zu NO_2 oxydiert wird. Kohlenmonoxyd, das bei der Schweißarbeit nur in geringer Menge gebildet wird und eine Verunreinigung des technischen Acetylens darstellt, spielt praktisch keine Rolle gegenüber den nitrosen Gasen. Obgleich nun die Gefahr einer Vergiftung beim Schweißen in engen Räumen bekannt ist, kommt es in der Folgezeit immer wieder zu ähnlichen Unfällen. GROSZKOPF berichtet 1952 über Vergiftungserscheinungen bei Arbeitern nach Schweißarbeiten in einer behelfsmäßig eingerichteten und schlecht belüfteten Schweißwerkstatt, van HECKE (1957) über eine tödliche Vergiftung bei einem Mann, der, nachdem er 4 Std lang in einem nur mäßig belüfteten Schiffskessel autogen geschweißt hatte, drei Tage nach seiner Arbeit unter dem Bilde eines akuten Lungenödems ad exitum kam.

Im Kriege spielen Vergiftungen mit nitrosen Gasen durch unvollständige Explosion von Nitrosprengstoffen, die sog. Deflagration, eine nicht unwesentliche Rolle. PFLESSER (1935) berichtet solche Todesfälle und zitiert aus dem Kriegssanitätsbericht, wonach bei der Skagerrakschlacht beispielsweise auf der "König" durch Kartuschbrand 75 Mann durch nitrose Gase zugrunde gingen. FRANKE, KRAULAND und RUCKENSTEINER (1948) referieren über einen Bombeneinschlag in einem Luftschutzkeller. Die hier auftretende Deflagration des Sprengstoffs ließ nitrose Gase entstehen. 16 Personen erkrankten an einem hochgradigen, toxischen Lungenödem; drei von ihnen kamen ad finem.

Zum geradezu klassischen Beispiel einer Massenvergiftung durch nitrose Gase ist der Brand eines Röntgenfilmlagers (Nitrocellulose) im Krankenhaus zu Cleveland geworden. STRAUB (1929) schreibt, daß bei dieser furchtbaren Katastrophe hunderte von Vergiftungen auftraten, von denen 126 tödlich endeten.

Eine ähnliche, ungewöhnliche Gruppenvergiftung wurde in neuerer Zeit aus Frankreich bekannt (BOURRET, TOLOT und SERUSCLAT, 1957). Hier geriet in einem Schuhgeschäft Baumwolle, die mit Nitrocelluloselösung getränkt war, in Brand und führte bei 5 Arbeitern zu schweren Intoxikationen, die in drei Fällen letal endeten.

Eine weitere, im Zuge der zunehmenden Motorisierung nicht zu unterschätzende Quelle von nitrosen Gasen sind Abgase der Verbrennungsmotoren. BISHOP und NEBEL (1958) fanden in Auspuffgasen je nach Treibstoffausnutzung Stickoxydkonzentrationen von 1000 bis hinauf zu 5000 ppm. Dieselmotoren sollen nach einer Untersuchung von HARKINS und GOODWINE (1964) nur halb so viel Stickoxyde erzeugen. Den Hauptanteil bildet hier Stickstoffmonoxyd, während Stickstoffdioxyd nur einen geringen Teil ausmacht. Hieraus resultiert eine nicht zu unterschätzende Rolle der nitrosen Gase für die Luftverunreinigung. Nach Berechnungen von MAGILL u. Mitarb. (1956) sollen in Los Angeles täglich 230 Tonnen Stickoxyde allein aus den Verbrennungsprozessen in Automotoren anfallen. TAYLOR (1960), der ebenfalls der Quelle der Stickoxyde nachgeht, gibt an, daß 65-85% dieser Oxyde in der Luft von Los Angeles aus den Auspuffgasen, 15-35% von anderen Brennmaterialien herstammen. REED und BARRETT (1965) kommen nach Untersuchung der Londoner Luft zu dem Ergebnis, daß der größte Teil der nitrosen Gase seinen Ursprung in den Auspuffgasen hat.

Bei analytischen Messungen der aktuellen Stickoxydkonzentration in der Luft von Großstädten erhielt man Werte zwischen 0,01 und 0,1 ppm. In Los Angeles wurden an Tagen intensivsten Smogs sogar Werte bis zu 0,4 ppm ermittelt (HAAGEN-SMIT, 1958; PERRY und TABOR, 1962; REED und BARRETT, 1965).

Auch im Tabakrauch werden nicht unerhebliche Konzentrationen von Stickoxyden gefunden. Während HAAGEN-SMIT u. Mitarb. (1959) beim Verbrennen verschiedener Tabaksorten Konzentrationen zwischen 145-655 ppm $NO + NO_2$ ermitteln, stellen NORMAN und KEITH (1965) im letzten Zug einer Filterzigarette Stickstoffmonoxydkonzentrationen von mehr als 1000 ppm fest. Zu dem in der letzten Zeit viel diskutierten Thema, ob zwischen Zigarettenrauchen und Bronchialcarcinom ein ursächlicher Zusammenhang besteht, sei bemerkt, daß den nitrosen Gasen keine cancerogenen Wirkungen nachgesagt werden können (HENSCHLER und ROSS, 1965 und 1966). Die besondere Gefährlichkeit der nitrosen Gase liegt in ihrer geringen Warnwirkung. HENSCHLER, STIER, BECK und NEUMANN (1960) haben ermittelt, daß Stickstoffdioxyd in einer Konzentration von 0,4 ppm immer wahrgenommen wird, bei wiederholter Einwirkung jedoch die Reizschwelle unterwandert

werden kann: Ein Ansteigen einer Stickstoffdioxydkonzentration innerhalb von 54 min von 0 auf 27 ppm löst keine Geruchsempfindung mehr aus.

Andererseits ist auch eine Toleranzsteigerung bei wiederholter Einatmung von nitrosen Gasen beobachtet worden. GROSZKOPF (1952), der über Nitrosegefahr beim Schweißen in kleinen Räumen referiert, schreibt: "Die Arbeiter bemerkten zwar, daß sie sich allmählich an die Arbeitsbedingungen gewöhnt hatten, daß sich aber besonders nach längerer Arbeitsunterbrechung (Urlaub) zu Anfang immer heftige Kopfschmerzen einstellten". In den Arbeiten von HENSCHLER und LAUX (1960) sowie HENSCHLER, HAHN und ASSMANN (1964) finden wir diese Angaben durch das Tierexperiment bestätigt: Im Tierversuch kann das Tödlichkeitsprodukt im Falle der 6 Std-Einatmung von Stickstoffdioxyd auf das 5- bis 6-fache gesteigert werden.

Daß Vergiftungen durch nitrose Gase immer wieder vorkommen, zeigen zwei ungewöhnliche Fälle einer Nitrosegasvergiftung mit tödlichem Ausgang nach Stickoxydulnarkose, die in neuester Zeit aus England bekannt wurden (ANNOTATIONS, Lancet, 1966). Durch mehrere Fehler bei der Herstellung von Stickoxydul und durch Versagen der Gasprüfgeräte gelangte mit Stickstoffdioxyd verunreinigtes Lachgas zur Verwendung als Narkotikum. Die Patienten zeigten im Anfangsstadium des Zwischenfalls eine Cyanose, die auf eine Methämoglobinämie zurückzuführen war und verstarben später unter dem Bilde eines Lungenödems.

B. PROBLEMSTELLUNG

Die im Anfangsstadium einer Vergiftung durch nitrose Gase oftmals beobachtete Cyanose hat schon frühzeitig zu der Annahme geführt, daß diese durch eine Methämoglobinbildung hervorgerufen sei. SCHWERIN (1911), CURSCHMANN (1911) und ZADECK (1916) gehören zu den ersten, die über Methämoglobinbildung bei akuten Vergiftungen berichten. FLURY (1930), der sich eingehend mit den nitrosen Gasen befaßt, findet heraus, daß die methämoglobinbildende Komponente Stickstoffmonoxyd ist, während Stickstoffdioxyd keine wesentliche Erhöhung des Methämoglobinspiegels bewirkt. PFLESSER (1935) bestätigt anhand eingehender Tierexperimente die Ergebnisse von FLURY, wonach also bei einer Intoxikation mit Stickstoffmonoxyd die Methämoglobinbildung sowie zentrale Symptome, bei der Stickstoffdioxydvergiftung Reizsymptome und das Lungenödem ganz im Vordergrund stehen.

Während die Tatsache der Methämoglobinbildung durch nitrose Gase und Nitroverbindungen nie angezweifelt worden ist, sind die Auffassungen über die Bindungsverhältnisse beim entstandenen Methämoglobinmolekül uneinheitlich. Das hat einmal seinen Grund darin, daß die Reaktionen, die in vitro nachvollzogen werden können, nicht uneingeschränkt auf die Vorgänge in vivo zu übertragen sind. Zum anderen sind die Reaktionen zwischen Methämoglobin und den Stickstoffverbindungen z.T. sehr instabil, die Reaktionsprodukte dissozieren, ehe sie sicher mit physiko-chemischen Methoden erfaßt werden können. HALDANE u. Mitarb. (1897) beobachteten erstmals, daß das Blut nitritvergifteter Mäuse von hellroter Farbe ist. Sie erklärten die Reaktion so, daß das Nitrit das Methämoglobin zu Hämoglobin reduziere und das dabei freiwerdende NO mit dem Hämoglobin zu NO-Hämoglobin reagiert. HEUBNER und MEIER (1926) betonen dagegen, daß sowohl bei Vergiftungen mit Nitrit als auch mit nitrosen Gasen stets Methämoglobin entsteht. Eine Bildung von NO-Hämoglobin erfolge nur postmortal zwischen Methämoglobin und überschüssigem Nitrit oder vielleicht auch mit dem aus diesem gebildeten Nitrat. JUNG und REMMER (1949), die Versuche mit Natriumnitrit in vivo und in vitro vornehmen, kommen zu dem Ergebnis, daß es sich bei dem gebildeten pathologischen Farbstoff um Nitrit-Methämoglobin handelt. Die Existenz von Nitrit-Methämoglobin als eigene Verbindung wird durch die Versuche in vitro von SCHWERD und STUMPF (1961) erhärtet. Es muß

betont werden, daß es sich stets um Nitritdosen im Überschuß handelte, wie sie im lebenden Organismus höchstens kurz ante finem vorkommen können.

Betrachten wir die Literaturberichte zur Kinetik der Bildung und Rückbildung von Methämoglobin nach Gaben von Natriumnitrit, so lesen wir beispielsweise bei KIESE und SOETBEER (1949) über die Bildung des Methämoglobins, daß nach Nitritgaben der Zuwachs der gebildeten Menge Methämoglobin einer einfachen Funktion folgt und die Rückbildung in den wesentlichen Anteilen einen gradlinigen Verlauf nimmt (COX und WENDEL, 1942; GREENBERG, LESTER und HAGGARD, 1943; KIESE, 1947). Nicht in Übereinstimmung damit stehen Ergebnisse aus unserem Institut von MANGOLD (1967), der nach Inhalationsversuchen mit Stickstoffmonoxyd bei Mäusen keinen dosisparallelen, sondern einen exponentiellen Anstieg von Methämoglobin fand. Die Befunde von MANGOLD könnten ein Hinweis sein, daß der pathologische Blutfarbstoff, der sich nach NO-Inhalation bildet, eine andere Konfiguration aufweist als der, der nach intravenösen Nitritgaben gefunden wird. Die Kinetik der Methämoglobinbildung nach intravenösen Natriumnitritgaben unterscheidet sich also von der nach Stickstoffmonoxyd-Inhalation. Es gilt nun die Frage zu klären, ob dieser unterschiedlichen Kinetik zwei voneinander verschiedene pathologische Blutfarbstoffe zugrunde liegen. Damit wird auch die Ansicht von HEUBNER und MEIER (1926), es komme sowohl nach Natriumnitrit als auch nach Einatmung von nitrosen Gasen zur Bildung von reinem Methämoglobin, in Frage gestellt. Der vorliegenden Arbeit sind daher folgende Aufgaben gestellt:

1. Die Kinetik der Bildung und Rückbildung von Methämoglobin während und nach Einatmung von NO zu untersuchen.
2. Die Kinetik der Bildung und Rückbildung während und nach intravenösen Gaben von $NaNO_2$ aufzuzeigen und mit den Ergebnissen von 1 zu vergleichen.
3. Spektrophotometrische Untersuchungen zur Differenzierung der erhaltenen, pathologischen Blutfarbstoffe anzustellen.

C. BLUTFARBSTOFFÄNDERUNG UNTER STICKSTOFFMONOXYD-INHALATION

I. METHODIK

Kaninchen und Ratten werden in einer geeigneten Versuchsanlage mit einem definierten NO/Luft-Gemisch begast. Während und nach der NO-Beatmung werden den Tieren in regelmäßigen Zeitabständen Blutproben entnommen zur Bestimmung des Methämoglobinspiegels. Bei Ratten werden außerdem mit Bluthämolysaten spektrophotometrische Untersuchungen zur Analyse von Blutfarbstoffen durchgeführt.

1. Herstellung von Stickstoffmonoxyd

Der NO-Herstellung liegt folgende chemische Reaktion zugrunde:

$$H_2SO_4 + NaNO_2 \longrightarrow NaHSO_4 + HNO_2$$

$$3\,HNO_2 \longrightarrow HNO_3 + 2\,NO.$$

Es wird so vorgegangen, daß in einem Rührkolben, der zur Hälfte mit 30%iger $NaNO_2$-Lösung gefüllt ist, 50%ige H_2SO_4 zutropft. Das dabei entstehende farblose Gas wird anschließend, um eventuelle Verunreinigungen mit NO_2 bzw. N_2O_4 zu beseitigen, aus dem Kolben durch zwei hintereinander geschaltete Waschflaschen mit konzentrierter H_2SO_4 geleitet. Eventuell vorhandenes NO_2 wird gebunden oder zu NO reduziert. In den Vorlagen bildet sich dann bläulich gefärbte Nitrosylschwefelsäure.

2. Versuchsanlage

Die Versuchsanlage kann man schematisch in vier Teile gliedern:

a) den Teil zur Mischung von Stickstoffmonoxyd mit Stickstoff und Luft,

b) die Expositionseinrichtung für die Tiere,

c) den Teil zur analytischen Erfassung von NO in der Luft,

d) das Röhrensystem für den Gastransport und die Luftbeimischung mit den erforderlichen Meßinstrumenten, Mischkugeln und Ventilen.

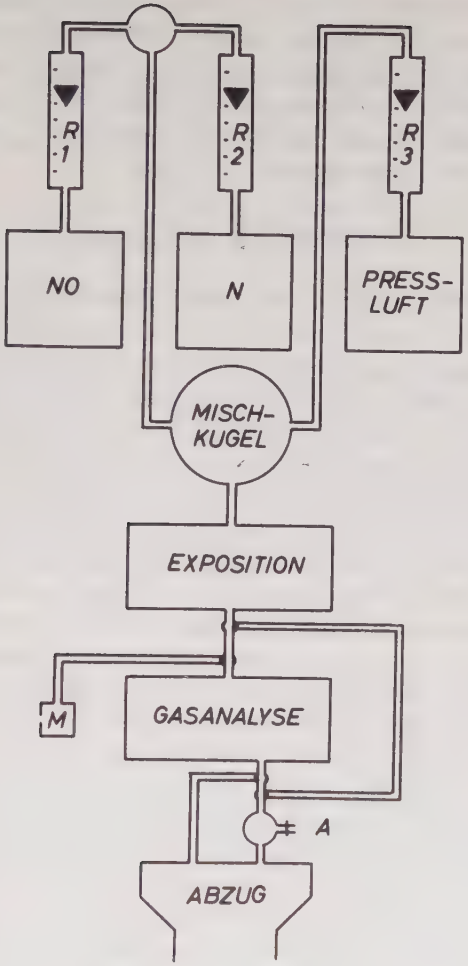

Abb. 1: Übersichtsschema der Versuchsanlage. -
R = Rotameter. M = Membranpumpe. A = Analysenentnahme.

Aufgabe der Versuchsanlage (Schema in Abb. 1) ist es, dem Versuchstier ein definiertes NO/Luft-Gemisch zuzuleiten, wobei besondere Sorgfalt darauf zu verwenden ist, daß das NO keine Aufoxydation zu NO_2 erfährt. Das wird erreicht, indem man das NO in einer ersten Stufe mit Reinstickstoff vorverdünnt und erst dann mit Luft zur endgültigen Konzentration vermischt. Dabei ist die Strömungsgeschwindigkeit des Gemisches so hoch zu halten (ca. 2000 l/h), daß NO noch nicht meßbar zu NO_2 umgesetzt wird. Im einzelnen wird folgendermaßen verfahren:

NO-Dosierung - NO/Luft-Gemisch

Aus einer Mariotte'schen Flasche tropft gesättigte NaCl-Lösung in den Gasbehälter. Dadurch wird das NO-Gas mit konstantem Druck in die Versuchsanlage geleitet. Nach Passieren einer Schwefelsäurevorlage zur Trocknung gelangt es in das Rotameter R_1 mit einem Meßumfang von 0,2-2 l/h. Ein vorgeschaltetes Feindosierungsventil aus Hart-PVC läßt die gewünschte Strömungsgeschwindigkeit einstellen. Der NO-Strom beträgt bei unseren Versuchen je nach geforderter Konzentration zwischen 0,2 l und 1,0 l/h. Diesem NO-Strom wird nach Passieren des Rotameters in einem Dreiwegestück Stickstoff als Schutzgas (vor Oxydation) zugeleitet, bevor das NO auf den Frischluftstrom trifft. Der Reinstickstoff entstammt einer Stahlflasche und gelangt über ein Reduzierventil und Rotameter R_2 zu dem Dreiwegestück, wo er dem NO beigemischt wird. Wir verwenden bei allen NO-Konzentrationen eine konstante Geschwindigkeit von 10 l N_2/h. In einer Mischkugel wird das N_2/NO-Gemisch mit Frischluft vereint. BODENSTEIN wies bereits 1918 darauf hin, daß bei geringen Konzentrationen die Reaktion $2\,NO + O_2 \rightarrow 2\,NO_2$ verhältnismäßig langsam abläuft. STOCK (1965) konnte anhand von analytischen Überprüfungen zeigen, daß eine Strömungsgeschwindigkeit von 2000 l/h ausreicht, um unter den hier gegebenen Versuchsbedingungen eine mit empfindlicher Methodik faßbare Aufoxydation von NO zu NO_2 zu verhindern. Die Frischluft kommt aus dem Vorratskessel einer Druckluftanlage. Ein Druckminderer, der gleichzeitig als Feinregulator ausgebaut ist, sorgt für einen gleichmäßigen Luftstrom. Durch Verwendung einer Wasserringpumpe, die die Druckluftanlage speist, ist die Luft staubfrei und frei von Öldämpfen und -nebeln. Außerdem verhindert die ständige Wasserkühlung bei der Kompression eine Erwärmung, so daß die Feuchtigkeit der Luft konstant erhalten bleibt. Auf kurzem Weg, über

eine zweite Mischkugel, gelangt das NO/Luft-Gemisch in den Expositionsraum und weiter durch die Gasküvette eines Spektrophotometers in den Abzug zur Ableitung über Dach.

3. Bestimmung von Stickstoffmonoxyd

Die Bestimmung der NO-Konzentration geschieht parallel mit zwei Methoden:

a) physikalisch durch direkte Gasmessung mit einem registrierenden Spektrophotometer (DK 2 Beckman),

b) chemisch mit der Phenoldisulfonsäuremethode in der Modifikation von JACOBS (1960).

Die Tatsache, daß NO ein starkes Absorptionsmaximum bei 214,65 m besitzt, wurde bereits von STOCK (1965) zur Messung der NO-Konzentration genutzt. Die Absorption wurde mit dem Spektrophotometer Modell DK 2 der Firma Beckman gemessen und registriert. Dabei werden die üblichen Flüssigkeitsküvetten durch 25 cm lange Gasküvetten ersetzt, durch die der Lichtstrahl durch Reflexion an Planspiegeln zweimal geleitet wird (STOCK).

Aufstellung einer Eichkurve

Bei verschiedenen NO-Strömen, denen jeweils eine konstante Aufzeichnung auf der Skala des Photometers entspricht, werden jeweils bei einer Konzentration 10 Analysen aus dem Gas/Luft-Strom unmittelbar nach Passieren der Meßküvette gezogen und nach der Phenoldisulfonsäuremethode in der Modifikation nach JACOBS (1960) aufgearbeitet. Zur Analysenentnahme werden geeichte, evakuierte 500 ml-Rundkolben verwendet, in die zuvor als Absorptionslösung 25 ml einer Lösung von 3 ml 3%igem Wasserstoffperoxyd in 100 ml n/10-H_2SO_4 einpipettiert werden. Während zweier Stunden wird das Luft/Gas-Gemisch in den Kolben häufig mit dieser Absorptionslösung durchgeschüttelt, um dann nach der bereits genannten Methode aufgearbeitet zu werden. Es entsteht eine gelbe Flüssigkeit, die bei 400 m im Spektrophotometer Beckman Modell B dreimal gegen eine Leerlösung gemessen wird. Die so erhaltenen Mittelwerte, die den Gehalt an Nitrat angeben, werden auf Nitrit umgerechnet, auf das bei der Probe

entnommene Gasvolumen bezogen und nach der Avogadro'schen Regel in ppm NO ausgedrückt. Änderungen der NO-Konzentration um 5 ppm können mit dem Spektrophotometer noch sicher erfaßt werden.

Unter Versuchsbedingungen wird das an den Schnauzen der exponierten Tiere vorbeiströmende Gas/Luft-Gemisch fortlaufend spektrophotometrisch und intermittierend chemisch-analytisch kontrolliert. Während die physikalischen Bestimmungen ständig am Ausschlag des Meßinstruments abgelesen werden können, werden die chemischen alle 20-30 min gezogen und können zur Überprüfung der zur Zeit aufgezeichneten Konzentrationen dienen. Die Aufzeichnungen des Spektrophotometers sind bei gleichbleibender Konzentration geradlinig konstant. Geringe Schwankungen sind durch den Rauschpegel des Instruments bedingt. Da die Schreibungen stets im Einklang mit den chemischen Analysen stehen, kann ebenso der Durchschnittswert der Analysen als Durchschnitt der tatsächlich vorhandenen Gaskonzentration gelten. Etwa notwendige Korrekturen können auch während des Versuchs vorgenommen werden. Da das NO/Luft-Gemisch am Meßinstrument vorbeigeführt werden kann, ohne den Versuchsablauf zu beeinflussen, ist eine Eichung gegen Luft jederzeit möglich, ohne den Gas/Luft-Strom zu ändern oder zu unterbrechen. Nacheichen wird notwendig bei Verschiebung der 100%-Linie; die Ursache ist meistens auf Erschütterungen oder auf Schwankungen im Stromnetz zurückzuführen.

4. Versuchstiere

Die Auswahl einer geeigneten Species für unsere Versuche wird von mehreren Gesichtspunkten bestimmt. Um zu einer möglichst breiten Aussage zu gelangen, verwendeten wir Tierarten, die sich möglichst unterschiedlich in bezug auf die Methämoglobinbildung verhalten. Schon lange ist bekannt, daß es gute und schlechte Methämoglobinbildner gibt. Zu den guten gehören beispielsweise Ratte, Katze und Mensch, während Kaninchen und Meerschweinchen ausgesprochen schlechte Methämoglobinbildner sind. Zu diesen Erwägungen kommen die rein versuchstechnischen, praktischen als auch wirtschaftlichen Gesichtspunkte hinzu. Aus den Gruppen der guten und schlechten Methämoglobinbildner wählten wir Kaninchen und Ratte aus. Als Versuchstier eignet sich das Kaninchen sowohl wegen

der guten Blutentnahmemöglichkeit am Ohr als auch wegen seiner Geduld. Wenngleich die Ratte auch nicht das andere Extrem des guten Methämoglobinbildners vertritt, so nimmt sie doch eine gute Mittelstellung ein. Ratten sind leicht reinrassig und in beliebiger Zahl zu erhalten. Sie verhalten sich günstig im Versuch und die Tierhaltung ist einfach. Schließlich ist auch aus wirtschaftlichen Gründen die Ratte als Versuchsobjekt besonders geeignet.

a. Kaninchen

Bei den Kaninchen handelte es sich um weibliche Tiere mit einem Gewicht von 2260-3000 g. Sie wurden von einer Würzburger Tierhandlung bezogen. Wir waren bemüht, bei gleichen Versuchen möglichst Geschwistertiere aus einem Wurf zu bekommen.

b. Ratten

Verwendet wurden weiße, weibliche Inzuchttiere vom Stamm Sprague Dawley. Die Tiere wurden vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover, geliefert. Ihr Gewicht schwankte zwischen 170 und 210 g. Nur weibliche Tiere kamen zum Einsatz.

Die Nahrung besteht bei beiden Tierarten aus Standard-Preßfutter und Leitungswasser. Die Kaninchen bekamen ssniff K und die Ratten ssniff M, hergestellt von der Futtermühle Georg Plange, Soest.

Bis zum Versuchsbeginn waren die Tiere im Tierstall, wo eine Klimaanlage für gleiche Temperatur und gleiche Luftfeuchtigkeit sorgte. Im Versuchslabor wurde ebenfalls durch eine Klimaanlage der Firma ATE gewährleistet, daß alle Versuche unter den gleichen Klimabedingungen abliefen.

5. Exposition der Versuchstiere

Beim Bau der Expositionseinrichtung gingen wir von der Überlegung aus, daß die Tiere nur mit der Schnauze in dem Gasstrom sein dürfen, so daß sie keine Möglichkeit haben, mit dem Fell die Atemluft zu filtrieren. Außerdem wäre bei Exposition des ganzen Tieres eine genügend gleichmäßige Ventilation durch das Auftreten von Turbulenzen nicht gewährleistet. Zudem würde die Verweildauer des NO/Luft-Gemisches so verlängert, daß nicht unerhebliche Anteile NO_2 entstehen würden. So exponierten wir nur Nase und Schnauze der Tiere. Sie nehmen die Atemluft aus einem von dem Gas/Luft-Gemisch durchströmten PVC-Kubus von 4 x 8 x 16 cm.

a. Kaninchen

Während des Versuchs hocken die Kaninchen in einem Kasten (30 x 14 x 17 cm) aus Hart-PVC, dessen eine Schmalseite eine 5,5 cm weite Bohrung zur Aufnahme und Fixierung des Halses aufweist, so daß das Tier gezwungen ist, den Kopf außerhalb der Box zu lassen. Über den Kopf wird eine konusförmige Kappe aus durchsichtigem Hart-PVC gestülpt, die mit ihrer Öffnung präzise in eine entsprechende Bohrung in der Seitenwand der Expositionskammer paßt. Zur verläßlichen Dichtung wird Schaumgummi verwendet.

b. Ratten

Grundsätzlich wird mit den Ratten genauso verfahren, nur daß hier anstelle der Box klarsichtige PVC-Röhren (17 cm Länge, 4,4 cm lichte Weite) mit einem verschiebbaren Stempel benutzt werden. Mit diesem Stempel, der sich in verschiedenen Stellungen fixieren läßt, wird die Ratte gegen eine Öffnung am anderen Ende des Recipienten gedrückt, so daß die Ratte gezwungen ist, die Schnauze ständig im Luft/Gas-Strom zu halten.

Auf die Anzahl der Tiere, die bei den einzelnen Versuchen eingesetzt werden, und die Dauer der jeweiligen Gasinhalation wird im einzelnen im experimentellen Teil der Arbeit eingegangen.

6. Herstellung einer Erythrocytenaufschwemmung mit vollständig zu Methämoglobin umgewandeltem Hämoglobin

Bei unseren Berechnungen zur Herstellung von Blut mit 100% Methämoglobingehalt durch $NaNO_2$ legen wir die Angaben von GREENBERG, LESTER und HAGGARD (1943) zugrunde. Sie geben die Summenformel

$$NaNO_2 + 2\ HbO_2 + H_2O = NaNO_2 + 2\ HbOH + O_2$$

an, die auch von JUNG und REMMER (1949) bestätigt wird. (In vivo liegen die Verhältnisse anders: BECKER, DORDONI und JUNG, 1943). Demnach werden von einem Molekül Nitrit zwei Äquivalente O_2Hb (oder 1/2 Molekül) vollständig zu Methämoglobin umgewandelt. Nach dieser Beziehung setzen wir die entsprechende Menge $NaNO_2$ in einer 0,85%igen NaCl-Lösung so an, daß auf 1 ml Blut 5 ml der $NaNO_2$/NaCl-Lösung kommen. Dadurch werden unerwünschte pH-Änderungen vermieden. Das angesetzte Blut wird bis zur vollständigen Umsetzung des Hämoglobins zu Methämoglobin stehengelassen. Wird bei der laufend vorgenommenen Methämoglobinbestimmung festgestellt, daß das Hämoglobin vollständig umgewandelt ist, waschen wir die Blutkörperchen 5 mal in physiologischer NaCl-Lösung und zentrifugieren jedesmal 10 min lang bei 2000 U/min. Nach dem letzten Dekantieren werden die zelligen Bestandteile mit 0,85%iger Kochsalzlösung auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Es wird nochmals eine Probe zur Methämoglobinmessung abgenommen und die Erythrocytensuspension sofort dem Versuchstier injiziert. Schon während des Auswaschens der Erythrocyten beginnt die Rückbildung des Methämoglobins. Mit der letzten Bestimmung wird die bereits vollzogene Rückbildung erfaßt. Diese liegt zwischen 7 und 13%.

7. Methämoglobinbestimmung

Um das Ansteigen des Methämoglobinspiegels im Blut während und die Rückbildung nach der Exponierung im NO/Luft-Gemisch zu verfolgen, werden in definierten Zeitabständen Blutproben entnommen, nach der Methode von EVELYN und MALLOY (1938) aufgearbeitet und anschließend im Spektralphotometer Beckman Modell B bei 630 mμ gegen aqua dest. gemessen. Da Methämoglobin bei 630 mμ eine charakteristische Absorptionsbande aufweist, werden von 4 verschieden angesetzten Hämolysaten die

Extinktionen bei dieser Wellenlänge gemessen. Aus den 4 ermittelten Extinktionswerten wird nach der Formel

$$\frac{E_1 - E_4}{E_2 - E_3} \times 100 = \% \text{ Methämoglobin}$$

der prozentuale Methämoglobinwert ermittelt. Die Werte $E_1 - E_4$ bedeuten die Extinktionen der verschiedenen Hämolysate. Die einzelnen Hämolysate entstehen aus jeweils 5 ml einer ca. 1%igen Erythrocytenlösung in eisgekühltem m/60 Phosphatpuffer vom pH 6,8 sowie folgenden Zusätzen:

E_1	Zusatz zum Hämolysat	2 Tropfen aqua dest.
	Reaktion	k e i n e
E_2	Zusatz zum Hämolysat	1 Tropfen $K_3(Fe(CN)_6)$ 1 Tropfen aqua dest.
	Reaktion	O_2Hb Met-Hb
E_3	Zusatz zum Hämolysat	1 Tropfen $K_3(Fe(CN)_6)$ 1 Tropfen KCN
	Reaktion	1. O_2Hb Met-Hb 2. Met-Hb Cyano-Met-Hb
E_4	Zusatz zum Hämolysat	1 Tropfen KCN 1 Tropfen aqua dest.
	Reaktion	Met-Hb Cyano-Met-Hb

Herstellung der Hämolysate: Aus der Schwanzvene der Ratte bzw. der Ohrvene des Kaninchens werden 0,3 ml Blut in eine mit 0,2 ml Na-Citrat (3,8%) beschickte Rekordspritze 2 ml gezogen. Dieses Citratblut wird in 25 ml eisgekühlten m/60 Phosphatpuffers vom pH 6,8 hämolysiert, anschließend werden die Stromata 1/2 Std lang bei 3000 U/min abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Von diesem werden je 5 ml in vier Erlenmeyerkolben pipettiert und nach der oben geschilderten Weise aufbereitet und gemessen. Zum Ansetzen unserer Reagenzien bzw. zum Spülen unserer Gefäße benutzen wir über $KMnO_4$ und $Ba(OH)_2$ destilliertes nitritfreies Wasser.

8. Spektrale Untersuchung von Bluthämolysaten

Um das Rattenblut auf pathologische Blutfarbstoffe zu untersuchen, werden spektrophotometrische Untersuchungen von Hämolysaten durchgeführt. Wegen der großen Affinität des Sauerstoffs zum Häm wird das Blut in O_2-freier Atmosphäre aufgearbeitet.

a. Versuche in vivo

Das Blut von Ratten, die mit einer Stickstoffmonoxydkonzentration von 300 ppm begast wurden und nach 1 Std verendeten, wird durch Herzpunktion gewonnen, in O_2-freiem Puffer hämolysiert, unter Sauerstoffabschluß zentrifugiert und dekantiert und in gedeckelte Küvetten gefüllt. Unter Luftabschluß wird im Spektrophotometer Beckman DK 2 das Absorptionsspektrum von 800 mμ bis 400 mμ aufgezeichnet.

V e r s u c h s a b l a u f: Während die Ratte dem NO/Luft-Gemisch exponiert ist, wird aus den Reagenzien, mit denen das Blut in Berührung kommt, der Sauerstoff durch Stickstoff ausgetrieben. Blut wird in 3,8% Natriumcitricum-Lösung entnommen. Alle Lösungen sind in luftdicht verschließbare Gefäße einpipettiert. In einem hermetisch abschließbaren Glaszylinder können mittels luftdicht befestigter Gummihandschuhe alle Arbeitsgänge unter Sauerstoffausschluß durchgeführt werden. Die Gläser und eine 2,0 ml Rekordspritze werden in das Zylinderinnere eingebracht. Darauf wird der Zylinder verschlossen und Reinstickstoff mit einer Geschwindigkeit von 800 l/h hindurchgeleitet. Der Reinstickstoff gelangt über einen

Gummischlauch ins Zylinderinnere. Am Ende des Schlauches findet sich ein Glasröhrchen, welches bei Bedarf in die jeweilige Flüssigkeit getaucht wird, um den Reinstickstoff durch das Reagenz zu leiten. Der Zylinder wird zunächst 2 min mit Reinstickstoff durchströmt, um seine Atmosphäre sauerstofffrei zu machen. Dann wird der Stickstoff 5 min durch jedes Gefäß geleitet, um aus den Pufferlösungen und einer 3,8% Natriumcitratlösung den Sauerstoff auszutreiben. Es wurden Phosphatpuffer der folgenden pH-Werte verwendet: pH 6,8; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; m/60 pH 6,8 zur Hämolyse des Blutes.

Der Ratte wird nach Ableben sofort der Thorax geöffnet, und durch Herzpunktion werden mit der vorbereiteten Spritze 0,3 ml Blut entnommen. Dieses Citratblut wird in einem Zentrifugenglas hämolysiert. Das luftdicht verschlossene Glas wird bei 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wird dekantiert und verdünnt auf 1:200. Die verdünnten Hämolysate werden dann in gedeckelte Küvetten gefüllt. Alle Arbeitsgänge werden in sauerstofffreier Atmosphäre ausgeführt.

b. Versuche in vitro

Bei den Experimenten in vitro werden weitgehend die gleichen Bedingungen hergestellt, denen auch das Tier im Versuch ausgesetzt ist. Sowohl die Exposition als auch die Aufarbeitung des Blutes finden unter vergleichbaren Verhältnissen statt. Die Gasaustauschfläche bzw. die Lungenoberfläche kann bei den Versuchen in vitro allerdings nicht adaequat ersetzt werden. Da es aber bei den spektralen Untersuchungen der Blutfarbstoffe nicht auf die zeitliche Abhängigkeit zwischen Expositionsdauer in dem NO/Gas-Gemisch und dem Methämoglobinanstieg, sondern auf vergleichbare Methämoglobinspiegel ankommt, kann dieser Faktor zunächst vernachlässigt werden. Das gleiche NO/Luft-Gemisch, das die Tiere zuvor zu atmen hatten, wird sowohl durch Vollblut als auch durch Erythrocytenaufschwemmungen mit definierter Geschwindigkeit durchgesaugt. Das Blut bzw. die Erythrocytenaufschwemmung werden anschließend im O_2-freien Puffer hämolysiert, unter O_2-Abschluß zentrifugiert, dekantiert und das Absorptionsspektrum aufgezeichnet. Dazu treffen wir folgende Versuchsanordnung: In einem zylindrischen Expositionsraum von 25 cm Höhe und 16 cm Durchmesser wird ein Glas von 12 cm Höhe und 6 cm Durchmesser mit 5 ml Blut gebracht. Durch die Expositionskammer strömt das

NO/Luft-Gemisch (NO-Konzentration 300 ppm, Luft 2000 l/h). Aus diesem Gas/Luft-Gemisch wird ein Strom von 20 l/h durch das Blut bzw. die Erythrocytenaufschwemmung geleitet, während der Hauptstrom auf kurzem Weg zum Spektrophotometer geführt und analysiert wird. Am Ende der Expositionszeit wird der Methämoglobinspiegel des Blutes bestimmt. Die Aufarbeitung des Blutes und das Ausmessen seines Spektrums wird unter den gleichen Bedingungen wie bei den Versuchen in vivo vorgenommen.

9. Differenzierung der Absorptionsspektren

Zur Differenzierung der erhaltenen Absorptionsspektren werden definiert hergestellte Vergleichsspektren herangezogen. Da es sich stets um mehrere Blutfarbstoffe nebeneinander handelt (Oxyhämoglobin bzw. nach Reduktion durch Stickstoff um Hämoglobin, um Methämoglobin und evtl. um NO-Hämoglobin), werden die erhaltenen Spektren immer Mischspektren sein müssen. Die exakte Differenzierung wird außerdem dadurch erschwert, daß die charakteristischen Absorptionsmaxima der einzelnen Blutfarbstoffe in dem kleinen Bereich von 500 mμ bis 630 mμ zusammengedrängt sind (Tab. 1).

Tab. 1: Die Lage der charakteristischen Absorptionsmaxima der betrachteten Blutfarbstoffe zueinander.

Blutfarbstoff-derivat	Maxima bei (mμ)		
O_2Hb	539	570	
Hb	555		
Met-Hb	500	576	630
NO-Hb	540	572,5	

Wir haben versucht, durch Registrieren der Spektren von definiert hergestellten Blutfarbstoffmischungen in hintereinandergeschalteten Küvetten entsprechende Vergleichskurven zu erhalten. Unter Sauerstoffabschluß werden jeweils zwei Blutfarbstoffhämolysate in aufsteigender und absteigender Konzentration in getrennte, gedeckelte Küvetten gefüllt. Diese werden dann hintereinandergeschaltet, in den Strahlengang des Photometers gebracht und gegen den entsprechenden Puffer als Leerwert gemessen.

Die Verdünnung in den Küvetten I und II entspricht zusammen genau der, die wir bei den einfachen Messungen verwenden (1:200). Nach diesem Modell registrieren wir Kombinationsspektren von Met-Hb und NO-Hb, von Met-Hb und HbO_2 sowie NO-Hb und HbO_2 bei einem pH von 6,8 (vgl. Tab. 2).

Tab. 2: Beispiel für ein Kombinationsspektrum aus Methämoglobin und Stickstoffmonoxyd-Hämoglobin

Küvette I Verdünnung 1:400	Küvette II Verdünnung 1:400
Met-Hb	NO-Hb
80%	20%
70%	30%
60%	40%
50%	50%
40%	60%
30%	70%
20%	80%
pH 6,8	

Weiterhin werden bei den Wasserstoffionenkonzentrationen von 6,8; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 und 8,0 folgende Spektren geschrieben:

NO-Hb
Met-Hb
O_2-Hb
Hb.

Herstellung von NO-Hämoglobin: In unverändertes Vollblut wird 15 min lang Reinstickstoff eingeleitet. Dabei wird Oxyhämoglobin reduziert. Anschließend wird in O_2-freier Atmosphäre 20 min lang NO durchgeleitet. Es entsteht NO-Hb. Wir konnten im Gegensatz zu JUNG und REMMER (1949) nicht feststellen, daß es sich um eine stabile Verbindung handelt. NO-Hämoglobin bildet sich an der Luft allmählich zu Methämoglobin um (s. Abb. 2).

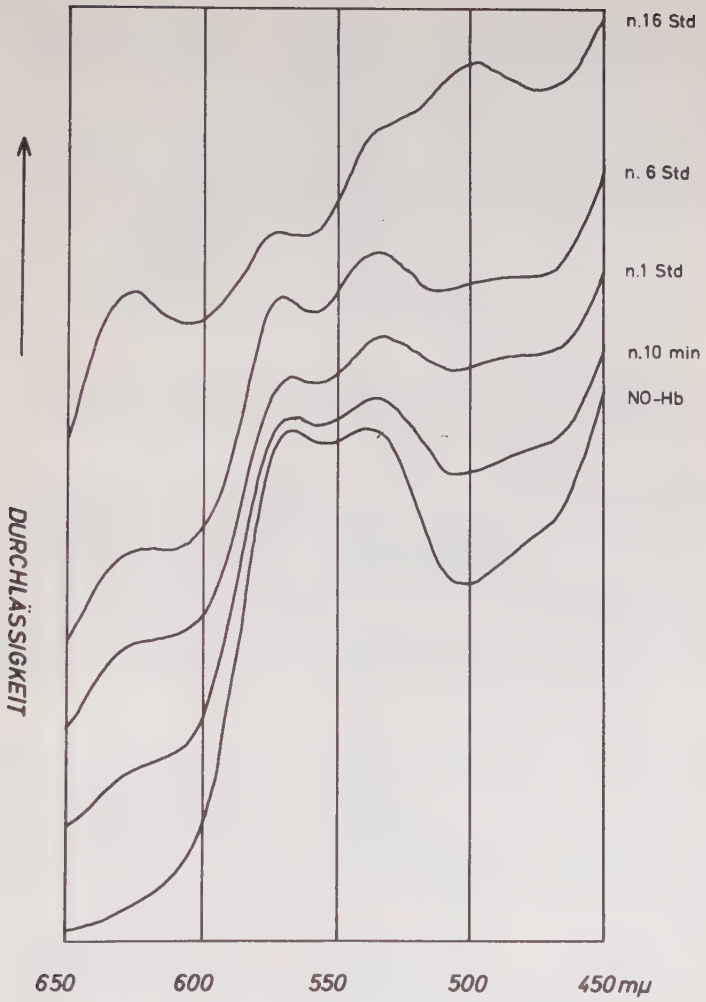

Abb. 2: Umwandlung von NO-Hb zu Met-Hb unter Sauerstoffzutritt (Schütteln mit Luft). Kurven wegen der besseren Übersicht untereinander aufgetragen. pH 6,8.

Herstellung einer Methämoglobinlösung: 5 ml Rattenblut werden in der bereits beschriebenen Weise mit $NaNO_2$ umgesetzt.

Herstellung von Oxyhämoglobin: Durch normales Vollblut wird 10 min lang reiner Sauerstoff geleitet.

Herstellung einer Hämoglobinlösung: In frisch entnommenes Vollblut wird über 10 min Reinstickstoff eingeleitet.

II. ERGEBNISSE

1. Kaninchen

a. Die Methämoglobinbildung während der Einatmung verschiedener Konzentrationen von Stickstoffmonoxyd

Insgesamt werden 10 Kaninchen verschiedenen Stickstoffmonoxydkonzentrationen jeweils 5 Std lang ausgesetzt. Bei Stickstoffmonoxydgehalten bis 100 ppm tritt noch keine wesentliche Erhöhung des Methämoglobinspiegels ein; der höchste gemessene Wert beträgt 2,4% Methämoglobin. Ein deutlicher Anstieg wird erstmals bei einer Konzentration von 300 ppm gefunden; er erreicht hier einen Endwert von ungefähr 15% Methämoglobin. Dieses Niveau ist bereits rund 1 1/2 Std nach Expositionsbeginn erreicht (vgl. Abb. 3 a).

Ein weiteres Tier bildet unter Einatmung von 600 ppm Stickstoffmonoxyd 20 bis 25% Methämoglobin, unter 800 ppm erreicht ein weiteres rund 30% Methämoglobin. Wird die Stickstoffmonoxydkonzentration weiter gesteigert, so steigt die Methämoglobinbildung rasch an: Ein Tier endet unter 850 ppm Stickstoffmonoxyd nach 5 Std bei ca. 55% Methämoglobin. Bei 1000 ppm Stickstoffmonoxyd sterben zwei Tiere; die beim Tode gefundenen Methämoglobinspiegel betragen annähernd 80%, die Todeszeit beträgt in beiden Fällen ca. 2 1/2 Std. In Abbildung 3 a sind, um eine gute Übersicht zu wahren, die Methämoglobinbildungskurven von nur vier Tieren stellvertretend für die Serie aufgezeichnet.

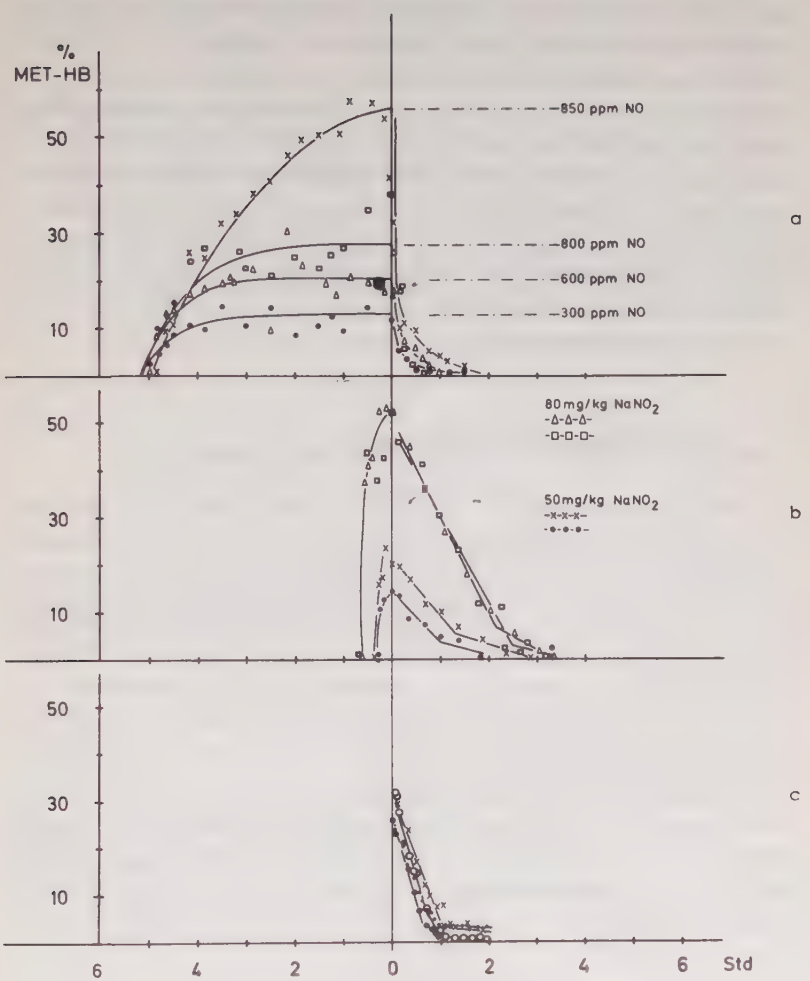

Abb. 3: Methämoglobinbildung und -rückbildung beim Kaninchen. a. Inhalation von NO/Luft-Gemischen. b. Intravenöse Injektion von Natriumnitrit. c. Reinfusion von Erythrocyten mit Methämoglobinspiegeln zwischen 87,4 und 94%, erzeugt durch Inkubation in Natriumnitritlösungen.

Es fällt auf, daß die Resultate der Einzelbestimmungen des Methämoglobingehaltes bei den Tieren mit mittleren Konzentrationen von 600 bis 800 ppm Stickstoffmonoxyd sehr stark vom Mittelwert abweichen, während sie sowohl bei geringen als auch bei hohen erreichten Methämoglobingehalten relativ wenig streuen. Fernerhin ist aus den Verläufen der Methämoglobinbildung abzulesen, daß bei niedrigeren Stickstoffmonoxydkonzentrationen schon nach relativ kurzer Zeit ein konstant bleibender Methämoglobinspiegel erreicht wird. Mit zunehmender Stickstoffmonoxydkonzentration rückt der Zeitpunkt der Erreichung des Endwertes vom Start weg. Bei der höchsten überlebten Stickstoffmonoxydkonzentration (850 ppm NO) bleibt die Progredienz bis zum Ende der Exponierung erhalten. Diese beiden Phänomene werden in der Diskussion noch näher zu erörtern sein.

b. Die Rückbildung von Methämoglobin

Bei allen überlebenden Tieren ist die Methämoglobinrückbildung durch möglichst häufige Blutentnahmen kontrolliert worden. Der bei der Stickstoffmonoxydinhalation erhobene, überraschende Befund hat noch eine zusätzliche Prüfung der Rückbildung nach intravenöser Zufuhr von Natriumnitrit sowie nach Beladung eines Teiles der Erythrocyten mit Methämoglobin eines Tieres in vitro veranlaßt.

aa. Nach Stickstoffmonoxydinhalation

Die Rückbildung des Methämoglobins verläuft bei allen Tieren außerordentlich rasch. Stets wird ein exponentieller Verlauf der Rückbildungskurven gefunden. Die Halbwertzeiten - die in allen Fällen graphisch bestimmt wurden - betragen zwischen 15 und 20 min. In jedem Falle ist die Rückbildung vor Ablauf von 2 Std beendet.

bb. Nach Natriumnitrit intravenös

Dosisabhängig bilden die Kaninchen nach intravenösen Gaben von 50 bis 80 mg Natriumnitrit/kg Körpergewicht Methämoglobinspiegel von 20 bis 50%. Der Anstieg erfolgt erwartungsgemäß sehr rasch. In ca. 30 min ist der Maximalspiegel erreicht. Die Rückbildung erfolgt in jedem Falle mit linearer Tendenz. Die Halbwertzeiten schwanken zwischen 45 und 90 min.

In allen Fällen erfolgt ein Abknicken der Rückbildungskurven unterhalb der 10%-Marke. Der weitere Verlauf ist dann wiederum, soweit er aus den verfügbaren Bestimmungen abgeleitet werden kann, linear (vgl. Abb. 3 b).

cc. Nach Reinfusion von Erythrocyten mit annähernd 100% Methämoglobin, erzeugt durch Natriumnitrit in vitro

Auch in diesen Versuchen ist die Rückbildungstendenz streng linear. Die Halbwertzeiten sind aber mit Werten zwischen 30 und 45 min nun deutlich kürzer als nach Natriumnitrit intravenös (vgl. Abb. 3 c).

2. Ratte

a. Die Methämoglobinbildung während der Inhalation verschiedener Konzentrationen von Stickstoffmonoxyd

In 12 Versuchen werden 38 Ratten NO/Luft-Gemischen ausgesetzt. Die eingeatmeten Stickstoffmonoxydkonzentrationen liegen zwischen 60 und 500 ppm. Durch ca. einstündige Blutentnahmen wird im Verlauf der Exposition der Anstieg des Methämoglobinspiegels im Blut der Tiere verfolgt. Die Bildungstendenz verläuft im Gegensatz zum Kaninchen bereits bei niedrigen Konzentrationen exponentiell. Auch die Halbwertzeiten sind verändert. Sie sind länger und liegen zwischen der zweiten und dritten Stunde. Schließlich reagieren die Ratten weitaus empfindlicher auf die Intoxikation. Bei einer Stickstoffmonoxydkonzentration von nur 60 ppm bilden die Tiere nach 6stündiger Exposition bereits zwischen 20 und 30% Methämoglobin. Der erreichte Methämoglobinspiegel ist auch hier stark dosisabhängig, so daß wir bei einer Dosiserhöhung von nur 20 ppm NO einen deutlichen Methämoglobinanstieg zu verzeichnen haben. Bei 80 ppm Stickstoffmonoxydkonzentration werden Werte um 50%, bei 100 ppm Werte um 60% Methämoglobin gefunden.

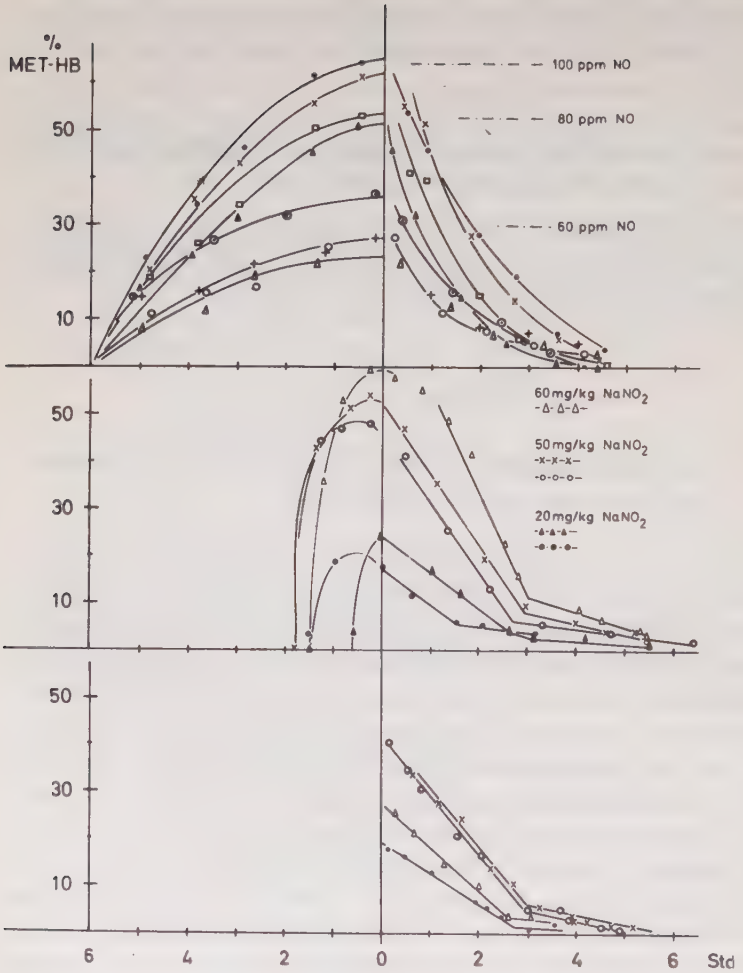

Abb. 4: Methämoglobinbildung und -rückbildung bei der Ratte. a. Inhalation von NO/Luft-Gemischen. b. Intravenöse Injektion von Natriumnitrit. c. Reinfusion von Erythrocyten mit Methämoglobinspiegeln zwischen 91,9 und 94,2%.

Wird in der Expositionskammer die Stickstoffmonoxydkonzentration weiter heraufgesetzt, so nimmt die Methämoglobinbildungsgeschwindigkeit außerordentlich rasch zu. Im Falle einer Stickstoffmonoxydkonzentration von 300 ppm kommen 2 Tiere nach 60 bzw. 65 min ad finem, bei 500 ppm beträgt die Zeit bis zur tödlichen Vergiftung bei 2 weiteren Tieren nur noch 30 und 40 min. Bei allen 4 Tieren lag der erreichte tödliche Methämoglobinspiegel um 80%.

b. Die Rückbildung von Methämoglobin

Bei den Ratten wird - wie bei den Kaninchen - die Methämoglobinrückbildung durch möglichst häufige und regelmäßige Blutentnahmen verfolgt. Die Ergebnisse werden dann ebenfalls denen nach intravenöser Zufuhr von Natriumnitrit gegenübergestellt und außerdem mit den Resultaten verglichen, die nach Beladung eines Teiles der Erythrocyten mit Methämoglobin ermittelt wurden.

Der augenfällige Unterschied liegt zunächst einmal in der Rückbildungsgeschwindigkeit. Diese verläuft bei allen Versuchen mit Ratten wesentlich langsamer. Das hat den Vorteil, daß die Tendenzen der Rückbildungsgeschwindigkeit deutlicher zum Ausdruck kommen.

aa. Nach Stickstoffmonoxydinhalation

Die Rückbildung des Methämoglobins nach 6stündiger Exposition im NO/Luft-Gemisch vollzieht sich innerhalb von 5 Std. In den beiden ersten Stunden verzeichnen wir die stärkste Regression. Die Halbwertzeit liegt bei der 90 min-Marke; je nach Ausgangshöhe etwas davor oder dahinter. 3 Std nach Expositionsende sind im Blut Methämoglobinwerte zwischen 10 und 5% zu finden, die in den nächsten beiden Stunden den Ausgangswert erreichen. Der Rückbildungsverlauf stellt sich als Exponentialfunktion dar (Abb. 4 a).

bb. Nach Natriumnitrit intravenös

Um verschieden hohe Ausgangswerte zu erhalten, wählten wir Konzentrationen von 20, 35, 50, 60 und 75 mg $NaNO_2$/kg Rattengewicht. Nach Injektion von 75 mg $NaNO_2$ sterben die Tiere unter dem Bilde einer Dyspnoe und hochgradiger Cyanose 60 min post injectionem. Bei Gaben von 60 mg $NaNO_2$/kg steigt der Methämoglobinspiegel innerhalb von 90 min bis auf 65-70%. Tiere, die 50 mg $NaNO_2$/kg i.v. verabfolgt bekommen, erreichen nach 90 min einen Methämoglobinspiegel um 50%. Bei Dosen von 20 mg Natriumnitrit intravenös werden immerhin noch Werte um 30% Methämoglobin gemessen. Die Rückbildungsgeschwindigkeit des Methämoglobins ist in erster Annäherung die gleiche wie nach NO-Inhalation, jedoch besteht eine andere Tendenz. Während im ersten Fall die Kurve einen exponentiellen Charakter hat, zeigt die Rückbildungskurve nach Natriumnitrit intravenös einen in den wesentlichen Anteilen geradlinigen Verlauf (Abb. 4 b).

cc. Nach Reinfusion von Erythrocyten mit annähernd 100% Methämoglobin, erzeugt durch Natriumnitrit in vitro

Bei 10 Ratten ermitteln wir die Rückbildungsgeschwindigkeit von Methämoglobin nach Injektion von umgewandelten, gewaschenen Erythrocyten.

Der erreichbare maximale Methämoglobinspiegel ist von zwei Faktoren abhängig:

1. Von der Blutmenge, die der Ratte durch Herzpunktion entnommen werden konnte.

2. Von dem tatsächlichen Methämoglobingehalt der Erythrocyten zur Zeit der Injektion.

Der höchste erreichte Methämoglobinspiegel nach Injektion der umgewandelten Erythrocyten liegt je nach Injektionsmenge bei den einzelnen Tieren zwischen 20 und 40% Methämoglobin. Die gefundene Rückbildungstendenz ist wie bei den entsprechenden Kaninchenversuchen streng linear. Die Halbwertzeit der Methämoglobinrückbildung im Rattenblut liegt bei 90 min und ist damit gegenüber dem Kaninchen deutlich verlängert.

Bei einem Methämoglobinwert von etwa 10% nimmt die Rückbildungsgeschwindigkeit ab, d.h. die Gerade wendet sich von der x-Achse weg, um im flacheren Winkel gegen 0 zu laufen. Dieser Punkt, an dem die Kurve umknickt, liegt nicht wie beim Kaninchen innerhalb der ersten 60 bis 90 min, sondern erst zwischen der zweiten und dritten Stunde. Die gesamte Rückbildungszeit liegt je nach Höhe des Ausgangsmethämoglobinspiegels zwischen 3 und 4 1/2 Std (Abb. 4 c).

Stellen wir unsere Ergebnisse von Kaninchen und Ratte gegenüber, so können wir folgende Aussagen machen:

Die unterschiedlichen Halbwert- und Rückbildungszeiten bei Kaninchen und Ratte erklären sich aus dem eingangs erwähnten Verhalten der einzelnen Species bei der Methämoglobinbildung. Werden die Ergebnisse der Methämoglobinrückbildung als Kurven dargestellt und miteinander verglichen, zeichnet sich in den einzelnen Fällen folgende Tendenz ab: Die Rückbildung nach intravenösen Natriumnitritgaben bzw. nach Injektion von methämoglobinhaltigen Erythrocyten verläuft im wesentlichen geradlinig. War diese Tendenz beim Kaninchen noch nicht ganz so deutlich, so kommt sie bei der Ratte - besonders im dritten Versuch - eindeutig zum Ausdruck. Die Methämoglobinrückbildung nach NO-Inhalation zeigt dagegen einen exponentiellen Verlauf (s. Abb. 3 a und 4 a). Sehen wir von den unterschiedlichen Halbwertzeiten ab, finden wir eine grundsätzliche qualitative Übereinstimmung der Methämoglobinrückbildung bei Kaninchen und Ratte.

3. Spektrale Untersuchungen von Blutfarbstoffderivaten der Ratte nach Stickstoffmonoxydeinwirkung in vivo und in vitro

Die grundsätzlich verschiedene Kinetik der Rückbildung von Methämoglobin nach Stickstoffmonoxydeinwirkung einerseits, nach Natriumnitritzufuhr und Reinfusion nitritbelasteter Erythrocyten andererseits läßt darauf schliessen, daß der durch Stickstoffmonoxyd in vivo gebildete Blutfarbstoff mit Methämoglobin nicht identisch ist. Der exponentielle Verlauf der Kurve läßt vermuten, daß die Rückbildung nicht auf enzymatischem Weg - wie beim Methämoglobin bekannt - erfolgt, sondern durch Abdissoziation einer locker

reversibel gebundenen Komponente vom Hämoglobinmolekül vonstatten geht.

Zur Klärung der Verhältnisse sind spektrophotometrische Untersuchungen an dem in Ratten unter der Stickstoffmonoxydeinwirkung gebildeten Blutfarbstoff im Vergleich mit bekannten Hämoglobinderivaten durchgeführt worden. Das methodische Vorgehen ist im Versuchsteil schon ausführlich beschrieben worden.

Das Spektrum vom Blutfarbstoff der Ratte, die mit 300 ppm Stickstoffmonoxyd tödlich vergiftet worden ist (vgl. Abb. 5, 2. Kurve von oben), ähnelt dem Methämoglobinspektrum (vgl. Abb. 6, obere Kurve). Indessen ergeben sich zwei Differenzen.

Der erste Unterschied betrifft den Spektralbereich um 560 mμ. Hier besitzt Methämoglobin nur eine angedeutete Schulter, während beim Rattenblut nach Stickstoffmonoxydvergiftung eine deutliche Einsenkung hervortritt. Diese Einsenkung wird gleichermaßen gefunden, wenn isolierte Rattenerythrocyten einem Stickstoff/Luft-Gemisch ausgesetzt werden (vgl. Abb. 5, 3. Kurve von oben). Diese Einsenkung kennen wir vom Stickoxydhämoglobin (Abb. 6, untere Kurve). Da das Blut der stickstoffmonoxydvergifteten Ratte unter Stickstoff aufgearbeitet worden ist, kann hier das Vorliegen von Anteilen an Oxyhämoglobin und ein entsprechender Einfluß ausgeschlossen werden.

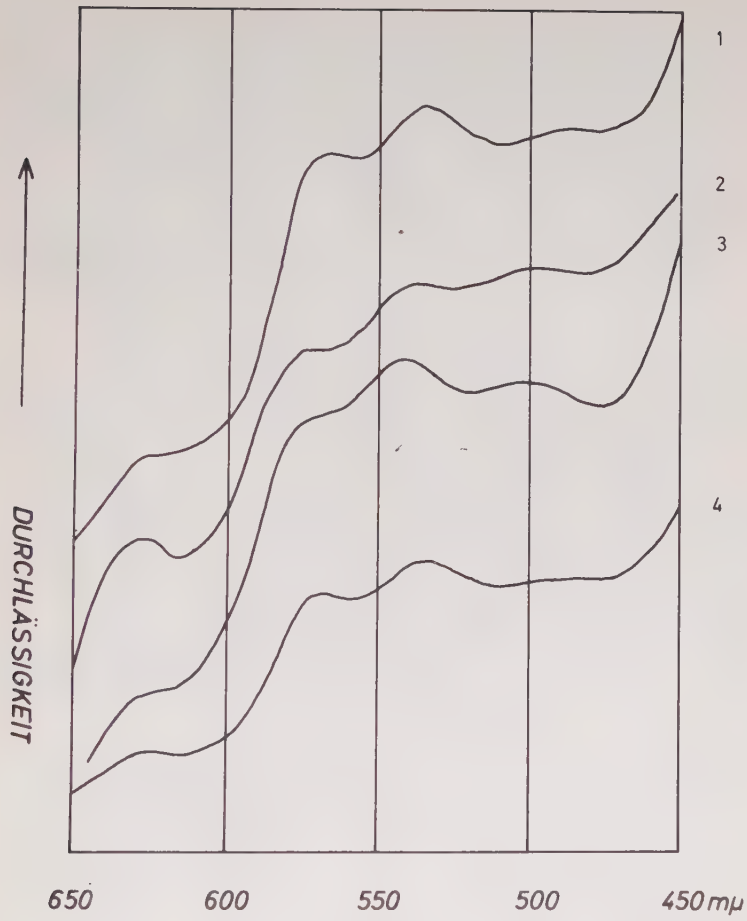

Abb. 5: Absorptionsspektren verschiedener Derivate von Rattenhämoglobin, pH 6,8. Der besseren Vergleichbarkeit sind die Kurven untereinander aufgezeichnet. 1. Mischspektrum aus 80% NO-Hb und 20% O_2Hb (getrennt in hintereinandergeschalteten Küvetten). 2. Tödliche Vergiftung mit 300 ppm NO. 3. Erythrocytensuspension mit 300 ppm NO in Luft durchgeperlt. 4. NO-Hb, 60 min nach Schütteln mit Luft.

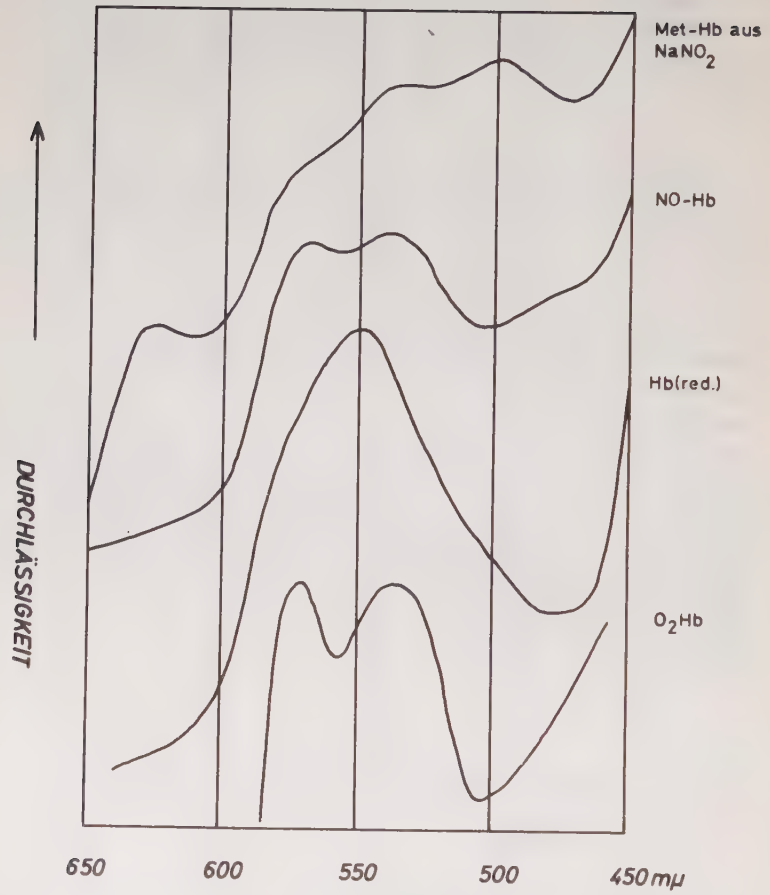

Abb. 6: Absorptionsspektren (pH 6,8) von Hämoglobinderivaten aus Rattenblut.

Der zweite wichtige Unterschied betrifft den Bereich um 620 mμ. Das Rattenblut nach Stickstoffmonoxydvergiftung hat hier eine deutliche Einsenkung, die nur dem Methämoglobin zugeordnet werden kann; bei Stickoxydhämoglobin (Abb. 6, 2. Kurve von oben) tritt sie nicht in Erscheinung. Insoweit kann man also vermuten, daß in dem Blut der stickstoffmonoxydvergifteten Ratte zum Zeitpunkt der Messung ein Gemisch aus Methämoglobin, Stickstoffmonoxydhämoglobin, selbstverständlich auch von Oxyhämoglobin, vorliegt. Das Methämoglobin scheint sich erst relativ langsam aus Stickstoffmonoxydhämoglobin im Organismus zu bilden; denn wir finden nur einen geringen Gehalt in Erythrocyten, die in einem Stickstoffmonoxyd/Luft-Gemisch in vitro gewonnen sind (vgl. Abb. 5, 3. Kurve von oben).

Eine gewisse Bestätigung bringen Versuche, bei denen reines Stickstoffmonoxydhämoglobin mit Sauerstoff umgesetzt wurde. Die nach verschiedenen Zeiten beobachteten Mischspektren sind in Abb. 2 bereits dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, daß Stickstoffmonoxydhämoglobin langsam in Methämoglobin übergeht. Allerdings bleibt stets ein gewisser Restanteil der für Stickstoffmonoxydhämoglobin und Oxyhämoglobin charakteristischen Einsenkung bei 560 mμ bestehen. Diese Einsenkung finden wir deutlich wieder bei einem aus zwei hintereinandergeschalteten Küvetten gewonnenen Mischspektrum von 80% Stickstoffmonoxydhämoglobin und 20% Oxyhämoglobin (Abb. 5, Kurve Nr. 1). Diesem Mischspektrum fehlt andererseits die für Methämoglobin charakteristische Depression um 620 mμ.

Damit haben die durchgeführten spektralen Untersuchungen einen Hinweis dafür geliefert, daß sich mit Rattenblut unter der Inhalation von Stickstoffmonoxyd nicht nur Methämoglobin bildet, sondern daß noch ein anderes pathologisches Blutfarbstoffderivat vorliegt. Seine Identifizierung war nicht mehr Aufgabe dieser Arbeit.

D. DISKUSSION

Jede Auswertung von biologischem Material offenbart eine Anzahl exogener und endogener Faktoren, die oft zu schwer deutbaren Phänomenen Anlaß geben können.

Zu den exogenen Faktoren zählen die Ernährung der Tiere sowie die Tierhaltung. Auch ist bekannt, daß klimatische Einflüsse (BADER 1960) eine gewisse Rolle spielen können. Unter den endogenen Faktoren verstehen wir die Lebensgewohnheiten der Tiere, ihren Lebens- und Tagesrhythmus. Das Geschlecht wie auch das Alter sind nicht zu unterschätzende Faktoren. So untersuchten MÜLLER-OERLINGHAUSEN und BAETHKE (1966) die Methämoglobinbildung bei der Katze durch Phenacetin und stellten hier eine deutliche Abhängigkeit der erreichten maximalen Hämoglobinkonzentration vom jeweiligen Alter der Tiere fest.

Wir haben versucht, diese Parameter soweit als möglich auszuschalten. Verglichen wurden nur Gruppen von weiblichen Tieren aus gleicher Zucht von annähernd gleichem Alter. Der zeitliche Ablauf der Versuche wurde stets in dieselbe Tageszeit gelegt, die Räume waren konstant vollklimatisiert.

Die Herstellung von Stickstoffmonoxyd sowie dessen physikalische und chemisch-analytische Erfassung haben sich bereits seit mehreren Jahren an unserem Institut bewährt. Die physikalische Analyse wurde mit dem registrierenden Spektrophotometer durchgeführt, das schon geringe Schwankungen im NO-Strom von 5 ppm erfaßt.

Die chemisch-analytische Erfassung von NO mit der von JACOBS (1960) angegebenen Phenoldisulfonsäuremethode steht sehr gut im Einklang mit den Werten, die wir aus der physikalischen Messung erhalten. Anhand der sich aus diesen Werten ergebenden Eichkurve, die nur geringe Streuung aufweist, kann auf eine gute Reproduzierbarkeit der NO-Konzentrationen in unseren Versuchen geschlossen werden.

Die Methämoglobinbestimmung nehmen wir nach der Methode von EVELYN und MALLOY (1938) vor. Dieses Verfahren ist an unserem Institut immer wieder zur Bestimmung von Methämoglobin herangezogen worden. Unsere Normalwerte für Methämoglobin liegen für Kaninchen zwischen 0,4 und 1,5%, bei den Ratten zwischen 1,6 und 3,7% und damit höher als die in der Literatur angegebenen Werte (KIESE 1946). Die Frage, ob die angewandte Methode in den Bereichen um 1% noch exakt arbeitet, muß offen bleiben. Für die höheren Bereiche hat sich die Bestimmungsmethode als zuverlässig erwiesen.

Bei den Versuchen zur Kinetik der Bildung von Methämoglobin während der Stickstoffmonoxydinhalation zeigt sich das typische Bild von Sättigungskurven. Das entspricht zunächst nicht der Erwartung. Wenn es richtig ist, daß sich Stickstoffmonoxyd mit Oxyhämoglobin unmittelbar zu Methämoglobin umsetzt, so müßte ein linearer Anstieg der Methämoglobinkonzentration im Blut eintreten. Die Charakteristik dieser Kurve dürfte auch nicht grundsätzlich verändert werden durch die Tatsache, daß der Organismus fortlaufend Methämoglobin reduziert; denn diese Reduktion geht als enzymatische Leistung bei den einzelnen Species in konstanter, d.h. von der Methämoglobinkonzentration unabhängiger Rate vor sich (GELINSKI 1940, KIESE und WEIS 1943, KIESE 1947). Daraus würde sich ableiten, daß die Bildungskurve von Methämoglobin unter Stickstoffmonoxydinhalation sich nur verschiebt, nicht aber ihre Tendenz ändert.

Tatsächlich haben aber die spektralphotometrischen Untersuchungen einen Hinweis geliefert, daß inhaliertes Stickstoffmonoxyd nicht in eine alleinige Methämoglobinbildung eingeht. Es gibt bereits einen Hinweis im Schrifttum, daß nach Einwirkung von Stickstoffmonoxyd Stickstoffmonoxydhämoglobin gebildet wird. SANCIER, FREEMAN und MILLS (1962) haben bei Messung der ESR (Electron spin resonance) Stickstoffmonoxydhämoglobin identifiziert. Sie haben es bei in vitro-Versuchen gefunden; der Nachweis in vivo steht aber noch aus.

Unterstellt man, daß sich ein reversibles Umwandlungsprodukt zwischen Hämoglobin und Stickstoffmonoxyd bildet, so würde tatsächlich der Typ der Sättigungskurve entstehen, wie wir ihn z.B. vom Kohlenstoffmonoxydhämoglobin kennen. Zur Untermauerung dieser These haben wir versucht,

Stickstoffmonoxyd oder Stickstoffmonoxydumwandlungsprodukte in der Exhalationsluft von Kaninchen im unmittelbaren Anschluß an eine nahezu tödliche Stickstoffmonoxydvergiftung nachzuweisen. Der Nachweis ist nicht geglückt; eine Klärung der tatsächlichen Verhältnisse muß einer späteren Untersuchung vorbehalten bleiben. Es könnte auch sein, daß das inhalierte und an Hämoglobin gebundene Stickstoffmonoxyd nach der Dissoziation vom Hämoglobinmolekül im Organismus anderweitig gebunden oder umgewandelt wird. Jedenfalls spricht das hier vorgelegte experimentelle Material dafür, daß bei der Stickstoffmonoxydvergiftung kein reines Methämoglobin vorliegt.

Ein weiteres Indiz für diesen Schluß liefert die Untersuchung der Methämoglobinbildungskurven unter Stickstoffmonoxydinhalation beim Kaninchen. Dabei war aufgefallen, daß bei niedrigen Konzentrationen frühzeitig, bei höheren zunehmend später eine Sättigungskonzentration erreicht wird. Dieses Phänomen könnte darauf beruhen, daß sich mit zunehmendem Ausfall des Hämoglobins für den Sauerstofftransport die Atmung vertieft. Damit würde die Stickstoffmonoxydaufnahme vermehrt, und es würde eine Beschleunigung der Methämoglobinbildung auftreten. Änderungen der Atmung dürften auch verantwortlich sein für die starke Streuung der Einzelwerte bei der Ausbildung der mittleren Hämoglobingehalte von etwa 20 bis 40%. Bei transitorischer Vertiefung der Atmung würde der Bestand des Organismus an Stickstoffmonoxyd - in welcher Form auch immer - ansteigen, bei verminderter Atmung entsprechend absinken. Solche Irregularitäten der Atmungsgröße sind bei Kaninchen häufig zu beobachten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Nach herkömmlicher Schrifttumsmeinung soll inhaliertes Stickstoffmonoxyd mit Oxyhämoglobin unter Bildung von Methämoglobin reagieren. Dementsprechend müßte unter der Einatmung einer konstanten NO-Konzentration der Methämoglobinspiegel linear ansteigen. Einige neuere, orientierende Untersuchungen deuten aber auf eine nicht lineare Abhängigkeit hin. Zur Klärung der Verhältnisse werden daher an zwei Tierarten, die unterschiedlich gut Methämoglobin bilden, systematische Untersuchungen zur Bildungsgeschwindigkeit von Methämoglobin, unter der Inhalation konstanter NO-Konzentrationen, durchgeführt. Im Anschluß daran wird die Rückbildung von Methämoglobin untersucht und mit den Verhältnissen der Methämoglobinbildung nach intravenösen Natriumnitritgaben und nach Infusionen von extrakorporal mit Natriumnitrit belasteten Erythrocyten verglichen. Die Versuche wurden mit Ratten und Kaninchen durchgeführt.

Die Tiere inhalieren Gemische von reinem, d.h. noch nicht in NO_2 umgewandeltem Stickstoffmonoxyd in Luft. Die Konzentrationen werden fortlaufend physikalisch und chemisch-analytisch kontrolliert. Sowohl bei Kaninchen als auch bei Ratten zeigen die Methämoglobinwerte Kurven, die als reine Sättigungskurven zu deuten sind. Beim Kaninchen stellt sich bei 300 ppm NO nach ca. 2 Std ein konstanter Spiegel von ca. 15%, unter 800 ppm NO nach 4 Std ein konstanter Spiegel von ca. 30% Methämoglobin ein. 850 ppm NO lassen nach 5 Std 55% Methämoglobin entstehen, bei 1000 ppm NO sterben die Tiere nach ca. 2 1/2 Std mit nahezu 80% Methämoglobin. Ratten bilden unter 60 ppm NO 20-30%, unter 80 ppm NO um 50%, unter 100 ppm NO 60-65% Methämoglobin; die Sättigung wird hier stets später, frühestens nach 5 Std erreicht. Die Rückbildung des als Methämoglobin bestimmten pathologischen Blutfarbstoffes nach NO-Inhalation erfolgt bei beiden Tierarten - unabhängig vom Ausgangswert - in streng exponentieller Abhängigkeit. Beim Kaninchen beträgt die Halbwertzeit 15-20 min, bei der Ratte ca. 90 min.

Dagegen verläuft die Rückbildung von Methämoglobin sowohl nach intravenöser Injektion von Natriumnitrit als auch nach Reinfusion von mit Methämoglobin gesättigten Erythrocyten linear, wie es beim Vorliegen eines rein enzymatischen Prozesses zu erwarten ist. Die Befunde deuten darauf

hin, daß unter der Inhalation von Stickstoffmonoxyd nicht oder nicht nur Methämoglobin entsteht. Diese Annahme wird gestützt durch die Aufzeichnung der Spektren des Blutfarbstoffs, der am intakten Tier wie auch nach Entnahme von Erythrocyten in vitro dem Stickstoffmonoxyd/Luft-Gemisch ausgesetzt war: Die Absorptionskurve ähnelt zwar weitgehend der von Methämoglobin, weist aber doch bei 560 und bei 620 mμ Abweichungen auf, die weder durch gleichzeitig vorhandenes Oxyhämoglobin noch durch reduziertes Hämoglobin erklärt werden können. Der Versuch, eventuell vom Blutfarbstoff oder von anderen Bindungsarten im Organismus wieder freiwerdendes NO in der Exhalationsluft chemisch nachzuweisen, schlug fehl. Die Identität des oder der durch NO erzeugten Blutfarbstoffe ist nicht geklärt worden.

Herrn Professor Dr.D. H e n s c h l e r möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates danken. Seine ständige Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima am Institut ermöglichten den erfolgreichen Abschluß der Arbeit.

F. LITERATUR

AHLBERG, N. und K. DAHLBERG: Acta med.scand. 109, 471 (1942)

ANNOTATIONS: Lancet II, 628 und 739 (1966)

BADER, H.: Zahnmed.Inaug.Diss. Würzburg (1960)

BECKER, T., F. DORDONI und F. JUNG: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 201, 200 (1943)

BISHOP, R.W. and G.I. NEBEL: Arch.Industr.Hlth. 17, 511 (1958)

BODENSTEIN, M.: Z.Elektrochem. 24, 183 (1918)

BODENSTEIN, M.: Z.physik.Chem. 100, 68 (1922)

BOURRET, J., F. TOLOT et F. SERUSCLAT: Arch.Mal.prof. 18, 315 (1957)

CHARIER: zit.n. SCHULTZ-BRAUNS, O.: Virchow's Arch.path.Anat. 277, 174 (1930)

COX, W.W. und W.B. WENDEL: J.biol.Chem. 143, 331 (1942)

CURSCHMANN, F.: Dtsch.med.Wschr. 37, 1025 (1911)

DESGRANGES, J.B.: zit.n. SCHULTZ-BRAUNS, O.: Virchow's Arch.path.Anat. 277, 174 (1930)

DRELL, S.D. and M.A. RUDERMAN: Infrared Phys. 2,189 (1962) zit.n. Chem.Abstr. 58, 13292 (1963)

DUISBERG, C.: Z.angew.Chem. 10,492 (1897)

EVELYN, K.A. and H.T. MALLOY: J.biol.Chem. 126, 655 (1938)

FLURY, F.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 157, 104 (1930)

FRANKE, H., W. KRAULAND und E. RUCKENSTEINER: Schweiz.med.Wschr. 78,256 (1948)

GELINSKY, G.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 195, 460 (1940)

GRAYSON, R.R.: Ann.Intern.Med. 45, 393 (1956) zit.n. J.Amer.med.Ass. 162, 1263 (1956)

GREENBERG, L.A., D. LESTER and H.W. HAGGARD:	J.biol.Chem. 151, 665 (1943)
GROSZKOPF, K.:	Zbl.Arbeitsmed. 2,143 (1952)
HAAGEN-SMIT, A.J.:	Science 128, 869 (1958)
HAAGEN-SMIT, A.J., M.F. BRUNELLE and J. HARA:	Arch.Industr.Hlth. 20,399 (1959)
HALDANE, J., R.H. MAKGILL and A.E. MAVROGORDATO:	J.Physiol. 21, 160 (1897)
HARKINS, J. and J.K. GOODWINE:	J.Air Pollut.Control Ass. zit.n. Chem.Abstr. 60,7846 (1964)
HECKE, W. van:	Ann.Méd.lég. 37,26 (1957) zit.n. Dtsch.Z.ges.gerichtl.Med. 47, 352 (1958)
HENSCHLER, D., E. HAHN und W. ASSMANN:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 249, 325 (1964)
HENSCHLER, D. und W. LAUX:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 239, 433 (1960)
HENSCHLER, D. und W. ROSS:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 250, 256 (1965)
HENSCHLER, D. und W. ROSS:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 253,495 (1966)
HENSCHLER, D., A. STIER, H. BECK und W. NEUMANN:	Arch.Gewerbepath.Gewerbehyg. 17, 547 (1960)
HEUBNER, W. und R. MEIER:	Zbl.Gewerbehyg.N.F. 3,95 (1926)
HUSEMANN, Th. und A. HUSEMANN:	Handbuch der Toxikologie, Verlag Georg Reimer, Berlin 1862, S. 794
JACOBS, M.B.:	The Chemical Analysis of Air Pollutants, Interscience Publishers, New York-London 1960, S. 209 und 351 ff.
JUNG, F. und H. REMMER:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 206, 459 (1949)
KIESE, M.:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 204, 288 (1947)
KIESE, M.:	Klin.Wschr. 24/25, 81 (1946)
KIESE, M. und M. SOETBEER:	Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 207, 437 (1949)

KIESE, M. und B. WEIS: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 202, 493 (1943)

LINDQVIST, T.: Acta med.scand. 118, 210 (1944)

LOWRY, Th. and L.M. SCHUMAN: J.Amer.med.Ass. 162, 153 (1956)

MAGILL, P.L., F.R. HOLDEN and C. ACKLEY: Air Pollution Handbook, McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto, London, p. 2-47 (1956)

MANGOLD, U.: Zahnmed.Inaug.Diss. Würzburg (1967)

MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B. und R. BAETHKE: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 253, 327 (1966)

NEUMANN, W. und K. BEYER: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 208, 47 (1949)

NICOLET, M.: J.Geophys.Res. 70, 691 (1965) zit.n. Chem.Abstr. 62, 5742 (1965)

NORMAN, V. and C.H. KEITH: Nature 205, 915 (1965)

PERRY, W.H. and E.C. TABOR: Arch.Environ.Hlth. 4, 254 (1962)

PERUTZ, M.F.: Proteins and Nucleic Acids, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York 1962, S. 37

PFLESSER, G.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.exp. Path.Pharmak. 179, 545 (1935)

RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie, 2. Aufl., Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1964, S. 602

REED, L.E. and C.F. BARRETT: Int.J.Air Wat.Poll. 9, 357 (1965)

ROCHE, L., A. MARIN et A. NICOLAS: Arch.Mal.prof. 18, 309 (1957)

ROCHE, L., F. TOLOT, R.G. TOURAINE et A. NICOLAS: Arch.Mal.prof. 18, 317 (1957)

SANCIER, K.M., G. FREEMAN and J.S. MILLS: Science 137, 752 (1962)

SCHWERD, W. und R. STUMPF: Blut 7, 341 (1961)

SCHWERIN: zit.n. CURSCHMANN, F.

SCHULTZ-BRAUNS, O.: Virchow's Arch.path.Anat. 277, 174 (1930)

STOCK, D.: Med.Inaug.Diss. Würzburg (1965)

STRAUB, W.: Münch.med.Wschr. 25, 1049 (1929)

TAYLOR, F.R.: Arch.industr.Hlth. 21, 386 (1960)

WADE, H.A., H.B. ELKINS and B.P.W. RUOTOLO: Arch.industr.Hyg. 1, 81 (1950)

ZADECK, J.: Berl.klin.Wschr. 53, 246 (1916)

LEBENSLAUF

Am 31.1.1936 wurde ich, Gunther Kraft, als Sohn des Arztes Dr. Gerhard Kraft und seiner Ehefrau Frieda Kraft, geb. Wickel, in Berlin geboren.

1942 wurde ich in Berlin-Reinickendorf eingeschult und legte 1957 an der Askanischen Schule zu Berlin-Tempelhof meine Reifeprüfung ab.

An der Freien Universität Berlin begann ich 1957 mit dem Medizinstudium und bestand im Juli 1964 an der Universität Würzburg das medizinische Staatsexamen.

Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich 9 Monate auf der chirurgischen Abteilung am Krankenhaus in Bad Pyrmont und 10 Monate am Institut für Toxikologie und Pharmakologie der Universität Würzburg tätig.

Zur Zeit leiste ich meine geburtshilfliche und gynäkologische Medizinalassistentenzeit am Krankenhaus Brückenau ab.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Würzburg, im April 1967

Gunther Kraft

BÖHLER-DRUCK

87 WÜRZBURG, Wirsbergstr. 10
Tel. 54143